

Aus der Forschung Pharma der Schering AG.
Berlin/Bergkamen

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der antidiabetischen Wirkung von Buformin.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der
Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

1971

vorgelegt von Wolfgang Kraaz aus Breslau

Aus der Forschung Pharma der Schering AG,
Berlin/Bergkamen

Tierexperimentelle Untersuchungen zum Mechanismus der antidiabetischen Wirkung von Buformin.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
der
Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Wolfgang Kraaz aus Breslau

Referent: Professor Dr. med. Martin Kramer

Korreferent: Professor Dipl.-Chem. Dr. med. Franz v. Bruchhausen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27.7.1971

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
2. Methodik
 - 2.1. Tiermaterial
 - 2.2. Substanzen, ihre Lösung und Applikation
 1. Buformin-Hydrochlorid
 2. Glymidin-Natrium
 3. Alloxan
 4. Streptozotocin
 5. Depot-Insulin
 6. Alt-Insulin
 7. ^{14}C -U-Glucose
 8. ^{14}C -1-Palmitinsäure
 9. l-Arabinose
 10. Äthylbutylthiobarbitalum
 - 2.3. Versuchsbedingungen
 1. Normale Tiere
 2. Versuche an diabetischen Tieren
 - 2.4. Versuchsanordnungen
 1. Blutuntersuchungen
 1. Intravenöser Glucosetoleranz-Test
 2. Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin bei diabetischen Tieren
 3. Stimulation der Insulinabgabe durch Glucose oder durch Glymidin-Natrium
 4. Abfall der Insulinkonzentration im Serum nach intravenöser Injektion von Rinderinsulin
 5. Änderung der l-Arabinosekonzentration im Blut und des l-Arabinoseverteilungsraumes unter dem Einfluß von Insulin
 2. Oxydation von ^{14}C -U-Glucose oder von ^{14}C -1-Palmitinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$
 1. ^{14}C -U-Glucose
 2. ^{14}C -1-Palmitinsäure
 3. Gewebsuntersuchungen
 1. Einbau von ^{14}C -U-Glucose in das Zwerchfellglykogen
 2. Bestimmung der Lactatkonzentration in der Muskulatur
 3. Bestimmung der Hexokinaseaktivität in der Muskulatur
 - 2.5. Bestimmungsmethoden
 1. Glucosebestimmung im Blut
 2. Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum
 3. Bestimmung der l-Arabinosekonzentration im Blut oder Serum
 4. Bestimmung der Radioaktivität im Blut oder Serum
 5. Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum
 6. Bestimmung von $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungs-Luft
 7. Bestimmung der Pyruvatkonzentration im Blut
 8. Bestimmung der Lactatkonzentration im Blut und in der Skelettmuskulatur
 1. Bestimmung im Blut
 2. Bestimmung in der Muskulatur
 9. Bestimmung des Zwerchfellglykogens und seiner spezifischen Aktivität nach Injektion von ^{14}C -U-Glucose
 10. Bestimmung der Hexokinaseaktivität in der Skelettmuskulatur
 1. Proteinbestimmung im Muskelhomogenat
 - 2.6. Statistik

3. Ergebnisse

- 3.1. Einfluß von Buformin in niedriger Dosierung auf die Glucosekonzentration im Blut nüchterner normaler und diabetischer Ratten.
 - 1. Versuche an normalen Tieren
 - 2. Versuche an diabetischen Tieren
- 3.2. Beeinflussung der Glucosetoleranz durch eine Behandlung mit Buformin
- 3.3. Beeinflussung der Serumkonzentration von ^{14}C -U-Glucose durch Vorbehandlung mit Buformin
- 3.4. Einfluß einer Buforminbehandlung auf die Insulinkonzentration im Serum
 - 1. Insulinkretion
 - 2. Insulinstoffwechsel
- 3.5. Einfluß von Buformin auf die blutzuckersenkende Wirkung von Insulin bei normalen und diabetischen Ratten.
 - 1. Versuche an normalen Tieren
 - 2. Versuche an diabetischen Tieren
- 3.6. Einfluß von Buformin auf die Glykogenkonzentration im Zwerchfell und den Einbau von ^{14}C -U-Glucose in das Zwerchfelliglykogen
- 3.7. Einfluß von Buformin auf die Oxydation von ^{14}C -U-Glucose zu $^{14}\text{CO}_2$
- 3.8. Einfluß von Buformin auf die arteriovenöse Blutglucosedifferenz
- 3.9. Einfluß von Buformin auf die Lactatkonzentration im Blut und in der Skelettmuskulatur und Pyruvatkonzentration im Blut
- 3.10. Einfluß von Buformin auf die Verteilung von l-Arabinose
- 3.11. Einfluß von Buformin auf die Hexokinaseaktivität in der Skelettmuskulatur
- 3.12. Einfluß von Buformin auf die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum und die Oxydation von ^{14}C -1-Palmitinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$
 - 1. Untersuchungen an nüchternen Tieren
 - 2. Untersuchungen nach intravenöser Injektion von Glucose

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Nach übereinstimmender Ansicht vieler Autoren beruht die hypoglykämische Wirkung von Sulfonylharnstoffen und Sulfonilpyrimidinen im wesentlichen auf einer vermehrten Freisetzung von Insulin aus den Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse (PFEIFFER, SCHÖFFLING und DITSCHUNEIT, 1969, s. d. weit. Lit.). Demgegenüber ist die Wirkungsweise der Biguanide, einer Substanzklasse, die ebenfalls zur Behandlung des Diabetes mellitus angewendet wird, noch nicht eindeutig geklärt. Übereinstimmung besteht lediglich dahingehend, daß diese Verbindungen nicht die Insulinabgabe stimulieren (CREUTZFELDT und MOENCH, 1958; MEHNERT, 1963; MOHNIKE, 1963; SEARLE und CAVALIERI, 1968; BECKMANN, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969). Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkungsweise dieser Verbindungen werden vor allem dadurch kompliziert, daß Biguanide nicht bei allen Spezies in gleicher Weise zur Erniedrigung der Glucosekonzentration im Blut führen, wie zum Beispiel Insulin oder β -cytotrope Sulfonamide. Beim stoffwechselgesunden Menschen beeinflussen Guanidinderivate die Blutglucose überhaupt nicht (GUTSCHE, 1960; MADISON und UNGAR, 1960; MICHEL, 1960; OTTO, 1960), während beim Diabetiker durch Biguanide die Glucosekonzentration im Blut und die Harnglucoseausscheidung reduziert werden können (POMERANZE und GADEK, 1959; MICHEL, 1960; MADISON und UNGAR, 1960; FAJANS, MOOREHOUSE, DOORENBOS, LOUIS und CONN, 1960; KRALL, BRADLEY und WHITE, 1960; SADOW, 1960; SCHWARTZ, MIRSKY und SCHAEFER, 1966; KAHAN, HIRSHLEIFER und MANDEL, 1966; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969). Meerschweinchen, normale oder diabetische Mäuse und Ratten, sowie Kaninchen reagieren auf verschiedene Guanidinderivate mit einer deutlichen Blutzuckersenkung (BECKMANN, 1968), bei chinesischen Streifenhamstern ist diese Substanzklasse dagegen wirkungslos (LOGE, 1970).

Diese Speziesdifferenzen betreffen nicht nur die Ansprechbarkeit gegenüber der gesamten Substanzklasse, es wurden auch artabhängige Unterschiede in der blutzuckersenkenden Wirkung verschiedener Biguanide beobachtet.

Während beim Diabetiker Phenformin (N_1 , β -Phenyläthylbiguanid, DBI^R) etwa doppelt so wirksam ist (MEHNERT, 1965) wie Buformin (N_1 , n-Butylbiguanid, Silubin^R), unterscheiden sich beim Meerschweinchen die zur Erzeugung der gleichen Wirkung notwendigen Dosen nicht (BECKMANN, 1968). Bei Mäusen ist dagegen Buformin die wirksamere Substanz (SÖLING, WERCHAU und CREUTZFELDT, 1963; BECKMANN, 1968). Die Dosiswirkungskurve verläuft bei diesen Tieren nach Phenformin-Applikation erheblich flacher, der Maximaleffekt des Buformins wird nicht erreicht (LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971). Eine gewisse Übereinstimmung zwischen verschiedenen Spezies besteht lediglich in Bezug auf die blutzuckersenkende Wirkung von Metformin (N, N-Dimethylbiguanid, Glucophage^R, Haurymellin^R). Sowohl beim Diabetiker als auch bei Meerschweinchen, Mäusen und Ratten muß zur Erzeugung einer Blutzuckersenkung Metformin in höherer Dosierung verabreicht werden als Buformin (MEHNERT, 1965; BECKMANN, 1968).

Die entscheidende Schwierigkeit, die bisher einer Aufklärung der Wirkungsweise von Biguaniden entgegenstand, beruht jedoch darauf, daß zur Erzeugung einer Hypoglykämie im Tierexperiment erheblich höhere Dosen aller bisher untersuchten Biguanide notwendig waren als zur Behandlung eines Diabetikers. Legt man zum Beispiel ein Körpergewicht von 70 kg zugrunde, so entspricht die tägliche Erhaltungsdosis von Buformin (0,2 - 0,3 g) (MEHNERT, 1965) einer Menge von etwa 3 - 4 mg/kg. Um bei Meerschweinchen eine 30 - 50%ige Blutzuckersenkung hervorzurufen, müssen 40 - 50 mg/kg per os (BECKMANN, 1968) oder 15 - 20 mg/kg subcutan (LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971) appliziert werden. Bei Mäusen ist diese Dosis noch höher (20 bzw. 300 mg/kg per os, BECKMANN, 1968). Dementsprechend bestehen auch erhebliche Unterschiede in den im Blut und in verschiedenen Geweben auftretenden Konzentrationen. So wurde zum Beispiel nach oraler Gabe einer beim Diabetiker

*

Wie erst nach Fertigstellung dieser Arbeit bekannt wurde, hat eine andere pharmazeutische Firma den generic name „BUFORMIN“ als Warenzeichen patentieren lassen. Aus technischen Gründen war eine Änderung dieses Namens in die chemische Bezeichnung N_1 , n-Butylbiguanid leider nicht mehr möglich.

wirksamen Dosis von 100 mg Buformin Plasmakonzentrationen beim Menschen gemessen, die während des gesamten Beobachtungszeitraumes unter 4×10^{-6} M lagen (BECKMANN und HÜBNER, 1965). Vergleichbare Untersuchungen an anderen Spezies existieren nicht. Von Beckmann wurden lediglich bei Ratten Serumkonzentrationen nach oraler Gabe von 50 mg/kg bestimmt (BECKMANN, 1965). Sie lagen in den ersten 2 Stunden zwischen $2,8$ und $3,5 \cdot 10^{-5}$ M. Unter der Annahme einer linearen Beziehung zwischen applizierter Menge und Plasmakonzentration würde dies bedeuten, daß nach Gabe einer blutzuckersenkenden Dosis von 300 mg/kg bei Ratten Plasmakonzentrationen von etwa $2 \cdot 10^{-4}$ M erreicht werden. Dieser Wert ist 50 mal höher, als die beim Menschen unter dem Einfluß einer therapeutischen Dosis auftretende Konzentration.

Aus diesem Grunde können die beim Studium der blutzuckersenkenden Wirkung von Biguaniden im Tierexperiment erhobenen Befunde nicht oder nur in beschränktem Maße zur Erklärung ihres therapeutischen Effektes herangezogen werden. Die bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, daß offenbar ein grundsätzlicher Unterschied zwischen dem Mechanismus der im Tierexperiment nachgewiesenen Blutzuckersenkung und der Verbesserung einer diabetischen Stoffwechsellaage beim Menschen bestehen.

Wie durch eine Reihe von Untersuchungen in vivo und in vitro gezeigt wurde, führen Biguanide in blutzuckersenkenden Dosen, beziehungsweise Konzentrationen, die unter diesen Bedingungen erreicht werden können, zu einer insulinunabhängigen Gluconeogenesehemmung in der Leber und Niere (MEYER, IPAKTCI und CLAUSER, 1967; HAECKEL und HAECKEL, 1968; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; PATRICK, 1966, 1968; ALTSCHULD und KRUGER, 1968; LOSERT LOGE und SCHILLINGER, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969; LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971). Außerdem wird die periphere Glucoseaufnahme, für die in erster Linie die quergestreifte Muskulatur verantwortlich ist, gesteigert. Dieser Effekt ist ebenfalls nicht an die Anwesenheit von Insulin gebunden (WILLIAMS, TYBERGHEIN, HYDE und NIELSEN, 1957; STEINER und WILLIAMS, 1958; FORBATH und CLARKE, 1959; RAFAELSEN, 1959; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969). Beide Wirkungen, sowohl die Hemmung der Gluconeogenese als auch die gesteigerte Glucoseaufnahme in der Peripherie, lassen sich durch eine Störung der Zellatmung (Behinderung des Elektronentransportes in der Atmungskette) erklären (FALCONE, MAC und SHRAGO, 1962; PRESSMAN, 1963; PRESSMAN, 1963; SCHÄFER, 1963; SCHÄFER, 1964). Infolge dieser Einschränkung des oxydativen Stoffwechsels (Senkung der O_2 -Aufnahme, Hemmung der Oxydation von Glucose und Pyruvat zu CO_2 , Hemmung der NAD-abhängigen Oxydationsschritte im Tricarbonsäurecyclus) und der damit einhergehenden Erniedrigung der ATP-Konzentration (UNGAR, PSYCHOYOS und HALL, 1960; DITSCHUNEIT, LOTZ, FRITZSCHE und PFEIFFER, 1961; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; ALTSCHULD und KRUGER, 1968; JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969; LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE, 1970) kommt es zu einer Aktivitätseinschränkung gluconeogenetischer (Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvatcarboxykinase) und Aktivitätszunahme glykolytischer Schlüsselenzyme (Phosphofructokinase) (ATKINSON, 1966; PATRICK, 1968). Die Blutzuckersenkung resultiert demnach aus einer verminderten Glucoseneubildung und einem gesteigerten glykolytischen Abbau des Zuckers bei gleichzeitiger Hemmung der Endoxydation. Charakteristisch ist deshalb eine Steigerung der Milchsäurebildung und ein Anstieg der Lactatkonzentration im Blut (TYBERGHEIN und WILLIAMS, 1957; CREUTZFELDT, 1959; UNGAR, 1959; SÖLING und CREUTZFELDT, 1960; WILLIAMSON, WALKER und RENOLD, 1963; SÖLING, WERCHAU und CREUTZFELDT, 1963; SÖLING, 1965; SÖLING, KNEER, MOOSHAGEN, SCUTELLA und CREUTZFELDT, 1967; LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971).

Da es sich bei derartigen Effekten letzten Endes um Auswirkungen einer Vergiftung der Versuchstiere handelt, die zwar die Glucosekonzentration im Blut erniedrigt, aber zu einer Verschlechterung der Energiegewinnung führt, können diese Erscheinungen weder zur Erklärung der Stoffwechselverbesserung des Diabetikers unter dem Einfluß von Biguaniden herangezogen werden, noch wäre es statthaft, beim Menschen eine Blutzuckersenkung durch einen derartigen

Eingriff hervorzurufen. Ähnliche Symptome wie im Tierexperiment (extreme Hypoglykämie, exzessiver Lactatanstieg im Blut mit Acidose) wurden beim Menschen nur dann beobachtet, wenn in suizidaler Absicht ein Vielfaches der täglichen Biguanid-Dosis eingenommen wurde oder infolge einer Störung der Nierenfunktion die Biguanidkonzentration im Serum angestiegen war (BERNIER, SPRINGATE und MILLER, 1963; TRANQUADA, BERNSTEIN und MARTIN, 1963; DAVIDSON, BOZARTH, CHALLONER und GOODNER, 1966; BIGELOW-SHERMAN und FOA, 1969).

Die Untersuchungen, die am Menschen nach Applikation therapeutischer Dosen von Buformin, Metformin oder Phenformin durchgeführt wurden, weisen vielmehr auf eine Steigerung des oxydativen Stoffwechsels von Glucose hin. Eine Steigerung der peripheren Glucoseaufnahme und Oxydation zu CO_2 wurde von SEARLE und Mitarbeitern (SEARLE, SCHILLING, PORTE, BARBACCIA, DE GRAZIA und CAVALIERI, 1966; SEARLE und CAVALIERI, 1968; SEARLE, GULLI und CAVALIERI, 1969) bei gesunden Versuchspersonen gemessen. Diese Autoren bestimmten die spezifische Aktivität der Blutglucose und der Kohlensäure in der Ausatemungsluft nach intravenöser Injektion von ^{14}C -Glucose. Die Tatsache, daß trotzdem die Glucosekonzentration im Blut nicht abnahm, fand ihre Erklärung in einer gesteigerten Glucoseabgabe aus der Leber. Als Erklärung für die blutzuckersenkende Wirkung der Biguanide beim Diabetiker wurde diskutiert, daß die bei einem Insulinmangel bereits erhöhte Glucoseneubildung nicht mehr im gleichen Maße gesteigert werden kann, so daß in der Bilanz der gesteigerte periphere Glucoseverbrauch überwiegt. Dieser Effekt ist offensichtlich an die Anwesenheit von Insulin gebunden, da Biguanide nur dann wirken, wenn die Bauchspeicheldrüse noch Insulin produziert. Deshalb werden diese Substanzen vor allem zur Behandlung des sogenannten Altersdiabetes verwendet, der zunächst durch eine Störung der Insulinsekretion, d.h. nur durch einen relativen Insulinmangel, charakterisiert ist (STERNE, 1964; MEHNERT, 1969; CREUTZFELDT, APPELS, KATTERMANN, FRERICHs, PROSCHEK, HUBRICH und SÖLING, 1968; HAESE, 1969; WERNER, 1969; SÖLING und DITSCHUNEIT, 1969). Beim juvenilen Diabetes, bei dem ein hochgradiger Insulinmangel besteht, oder nach einer Pankreatektomie war ein therapeutischer Effekt nicht nachweisbar. Die zur Substitution erforderlichen Insulindosen konnten jedoch in einigen Fällen reduziert werden (SKILLMAN, KRUGER und HAMWI, 1959; CREUTZFELDT, KÜMMERLE und KERN, 1959; TRANQUADA und BEIGELMAN, 1960; KRALL, BRADLEY und WHITE, 1960; HEIK, 1967).

Als Ursache dieses insulinsparenden Effektes der Biguanide, der sich unter anderem in einer Einschränkung der Insulinsekretion nach Glucosebelastung äußert (BERGER, DOWNEY und RAISMAN, 1968; HORTON, SHEIKOLISLAM und BRESSLER, 1968), wurde von Butterfield und Whicelow aufgrund von Perfusionversuchen am Unterarm von Diabetikern eine gesteigerte Bindung von Insulin am Wirkort, d.h. den Muskelzellen, vermutet, die zu einer Erhöhung der zellulären Glucoseaufnahme führt (BUTTERFIELD, 1967; BUTTERFIELD, 1968; BUTTERFIELD und WHICHELOW, 1968; WHICHELOW und BUTTERFIELD, 1969).

In jüngster Zeit wurden von GOMEZ und FELBER (1970) Befunde veröffentlicht, die auch noch eine andere Erklärung der beim Menschen unter dem Einfluß therapeutischer Dosen von Biguaniden beobachteten Steigerung der peripheren Glucoseutilisation erlauben. Sie beobachteten bei gesunden Versuchspersonen, daß nach Applikation von Buformin während einer 6-stündigen Glucoseinfusion die Blutzuckerkonzentrationen niedriger lagen als vor der Behandlung. Ausgehend von der Randle'schen Theorie, daß in der Skelettmuskulatur durch ein vermehrtes Angebot und eine damit verbundene erhöhte Utilisation von Fettsäuren die Aufnahme und Oxydation von Glucose behindert wird (RANDLE, 1965), diskutierten diese Autoren, daß Biguanide die Fettsäureoxydation zugunsten der Glucoseverwertung einschränken. Ein Anstieg des respiratorischen Quotienten von 0,75 auf über 0,9 unterstützte sie in dieser Annahme (GOMEZ, JEQUIER, RUEDI und FELBER, 1970).

Von diesen am Menschen erhobenen Befunden ausgehend sollte durch die vorliegenden Untersuchungen geprüft werden, ob es möglich ist, eine Verbesserung der Glucoseutilisation durch Biguanide auch im Tierexperiment nachzuweisen und gegebenenfalls zur Klärung der Ursache dieses Effektes

beizutragen. Zu diesem Zweck wurde an Ratten der Einfluß geringer, noch nicht blutzuckersenkender Buformindosen auf den Kohlenhydratstoffwechsel studiert. Hierbei interessierte besonders die Frage, ob mögliche Veränderungen der Glucoseutilisation und -oxydation durch Biguanide insulinabhängig sind und mit einer Beeinflussung des Fettsäureumsatzes einhergehen.

2. METHODIK

2.1. TIERMATERIAL

Als Versuchstiere dienten 120 - 160 g schwere männliche Sprague-Dawley Ratten (SPF, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover). Die Tiere erhielten als Standardkost Altromin-R-Trockenfutter und als Trinkflüssigkeit Leitungswasser ad libitum.

2.2. SUBSTANZEN, IHRE LÖSUNG UND APPLIKATION

Das Applikationsvolumen für alle anschließend aufgeführten Substanzen betrug 5 ml/kg. Lediglich Depot-Insulin wurde unverdünnt injiziert.

2.2.1

Buformin-Hydrochlorid (Chemie-Grünenthal, Stolberg, Silubin[®]) wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit einer Schlundsonde per os verabreicht.

2.2.2

Glymidin-Natrium (Glykodiazin, Redul[®], Schering A.G., Berlin) wurde zur oralen Applikation in destilliertem Wasser, zur intravenösen Injektion in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

Unbehandelte Kontrolltiere erhielten eine entsprechende Menge des jeweiligen Lösungsmittels.

2.2.3

Alloxan-tetrahydrat (Merck-AG, Darmstadt) wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und anschließend sofort intravenös injiziert.

2.2.4

Streptozotocin (Antibiotikum aus *Streptomyces achromogenes*, Upjohn Comp., Kalamazoo, Michigan, USA) wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, sofort mit 0,01 M Zitronensäure auf pH 4,5 eingestellt und in den folgenden 5 Minuten intravenös injiziert.

2.2.5

Depot-Insulin (Rinderinsulin, Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main, 40 IE/ml) wurde unverdünnt subcutan injiziert.

2.2.6

Alt-Insulin (Rinderinsulin, Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main, 40 IE/ml) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und intravenös injiziert.

2.2.7

^{14}C -U-Glucose (spezifische Aktivität: 2 - 4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, Radiochemical-Centre, Amersham, England) wurde in einer Dosis von 13,3 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ intravenös injiziert. Als Lösungsmittel diente bei diabetischen Tieren physiologische Kochsalzlösung, bei normalen Tieren 30%ige Glucoselösung (entsprechend 1,5 g/5 ml/kg Körpergewicht).

2.2.8

^{14}C -1-Palmitinsäure (1,33 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, Herst.: Dr. P.E. Schulze, Abt. Pharmakodynamik, Schering-AG., Berlin) wurde in einem geringen Volumen absoluten Äthanolis gelöst (Endkonzentration 4 %), mit physiologischer NaCl-Lösung, die 4 % Rinderserumalbumin enthielt, aufgefüllt und in einer Dosis von 13,0 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ intravenös injiziert.

2.2.9.

I-(+)-Arabinose (Merck-AG, Darmstadt) wurde in destilliertem Wasser zur intravenösen Injektion gelöst (1 oder 2 g/5 ml/kg Körpergewicht).

2.2.10.

Aethylbutylthiobarbitalum (Inactin[®], Promonta G.m.b.H., Hamburg) lag als Na-Salz vor und wurde in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Die Dosis betrug 60 mg/kg.

2.3. VERSUCHSBEDINGUNGEN

2.3.1.

Normale Tiere waren zum Zeitpunkt des eigentlichen Versuches 16 (oder 24) Std. nüchtern.

2.3.2.

Versuche an diabetischen Tieren wurden ebenfalls nach 16-stündigem Futterentzug durchgeführt.

Zur Erzeugung eines Diabetes mellitus wurde den Ratten nach 16-stündiger Nüchternheit entweder 80 mg/kg Alloxan oder 80 (100)mg/kg Streptozotocin intravenös injiziert.

Die Versuche wurden frühestens 1 Woche nach der Diabeteserzeugung vorgenommen, bei streptozotocindiabetischen Tieren in einem Fall bereits nach 2 Tagen. Für Untersuchungen im akut diabetischen Stadium eignet sich diese Substanz besser als Alloxan, da ihr cytotoxischer Effekt nahezu ausschließlich die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse betrifft (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD, 1967). Zur Substitution erhielten die Ratten bis 48 Std. vor Versuchsbeginn täglich 3 IE Depot-Insulin/Tier. Als Kontrolle für eine ausreichende Substitution diente das weitere Wachstum der Tiere.

2.4.

VERSUCHSANORDNUNGEN

Die Stoffwechselwirkungen des Buformins wurden nach unterschiedlich langer Vorbehandlungsdauer geprüft. Die Substanz wurde entweder einmalig oder mehrere Tage bis zu 2 Wochen morgens und abends oral appliziert. Die letzte Behandlung erfolgte in allen Fällen morgens nach 16 (24)-stündiger Nüchternheit. Zwischen 60 und 300 min danach wurden dann die einzelnen Untersuchungen durchgeführt.

2.4.1.

Blutuntersuchungen

Das Blut wurde entweder durch Dekapitation oder – bei mehrmaliger Abnahme – durch Punktion des retrobulbären Venenplexus entnommen. Zur Beantwortung spezieller Fragen wurde auch die Aorta abdominalis, Vena cava caudalis, Vena portae oder Vena femoralis punktiert; hierzu wurden die Tiere 15 oder 30 min vorher mit Inactin narkotisiert. Abnahmen aus mehreren Gefäßen am gleichen Tier erlaubten außer einer Bestimmung der absoluten Konzentration auch eine Berechnung der arteriovenösen Differenzen des untersuchten Substrates. Außer der Glucosekonzentration wurde der Lactat- und Pyruvatgehalt des Blutes bestimmt. In dem durch Zentrifugation gewonnenen Serum (3000 Upm, 15 min, Zimmertemperatur) wurde die Konzentration der freien Fettsäuren und des Insulins gemessen.

Einzelheiten über den Zeitpunkt und Ort der Blutentnahme, über die Dauer der Buforminbehandlung sowie die zusätzliche Applikation von Insulin oder Glymidin-Na sind den jeweiligen Tabellen und Abbildungen zu entnehmen. Außer diesen Bestimmungen im Blut nüchterner Tiere wurden folgende speziellen Untersuchungen durchgeführt:

2.4.1.1.

Intravenöser Glucosetoleranz-Test

Zur Prüfung der Glucosetoleranz erhielten die Ratten 60 min nach der letzten Buforminapplikation eine intravenöse Injektion von 1,5 g/kg Glucose. 5 und 22 min (oder 15 und 30 min) danach wurde den Tieren Blut zur Glucosebestimmung entnommen. Vorversuche hatten ergeben, daß unter diesen Bedingungen zwischen

der 3. und 30. Minute die Blutzuckerkonzentration exponentiell, d.h. bei semi-logarithmischer Auftragung linear, abfällt (Abb. 1).

Aus den zu den beiden Zeiten ermittelten Glucosekonzentrationen wurde nach der Formel

$$k_G = \ln \frac{BZ_{t_1}}{BZ_{t_2}} \cdot \frac{100}{\Delta t \text{ (min)}}$$

die Eliminationskonstante k_G als Maß für die Eliminationsgeschwindigkeit der injizierten Glucose errechnet.

Erhielten die Ratten zusammen mit der inaktiven Glucose auch ^{14}C -U-Glucose (13,3 $\mu\text{Ci/kg}$) injiziert, so wurde der Radioaktivitätsabfall im Blut (oder Serum) in gleicher Weise bestimmt und als Eliminationskonstante

$$k_2 = \ln \frac{\text{Akt.}_{t_1}}{\text{Akt.}_{t_2}} \cdot \frac{100}{\Delta t \text{ (min)}}$$

angegeben.

In einigen Fällen wurde zusätzlich der Quotient zwischen Radioaktivität im Blut und Blutzuckerkonzentration berechnet.

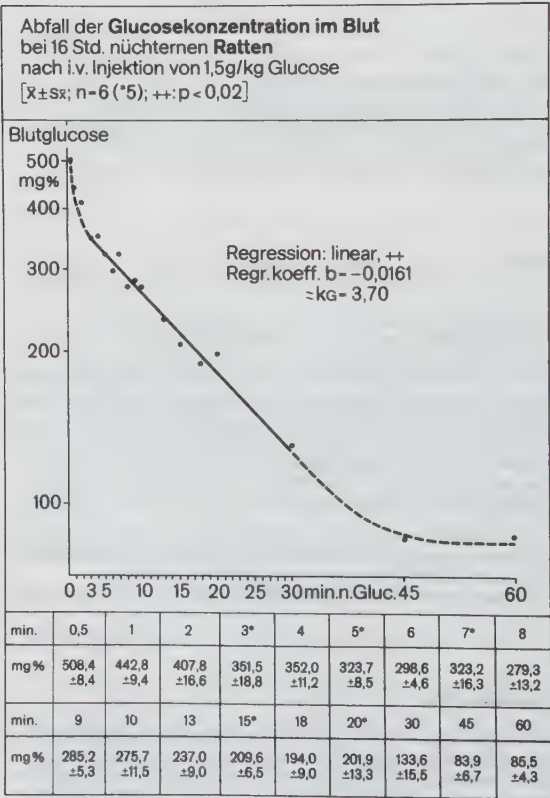


Abbildung 1

2.4.1.2.

Blutzuckersenkende Wirkung von Insulin bei diabetischen Tieren

75 Minuten nach der letzten Buforminbehandlung wurde den Tieren 0,5 IE/kg Alt-Insulin intravenös injiziert. Unmittelbar vorher sowie 10 min danach erfolgte je eine Blutentnahme zur Bestimmung der Glucosekonzentration. Der Insulineffekt wurde als Eliminationskonstante

$$k_2 = \ln \frac{BZ_{t_1}}{BZ_{t_2}} \cdot \frac{100}{\Delta t \text{ (min)}}$$

angegeben.

2.4.1.3.

Stimulation der Insulinabgabe durch Glucose oder durch Glymidin-Natrium

Für diese Untersuchungen wurde den Ratten 60 min nach der letzten Buformingabe Glymidin-Natrium (250 mg/kg) oder Glucose (1,5 bzw. 3,0 g/kg) intravenös injiziert. Nach weiteren 15 min wurde Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus oder der Vena cava caudalis gewonnen. Da im zweiten Fall der Bauchraum eröffnet werden mußte, wurden diese Tiere 30 min vor der Blutentnahme mit Inactin^R narkotisiert. Die im Serum gemessene Insulinkonzentration diente als Maß für die Insulininkretion.

2.4.1.4.

Abfall der Insulinkonzentration im Serum nach intravenöser Injektion von Rinderinsulin

An normalen Ratten wurden diese Versuche nach 24-stündigem Futterentzug vorgenommen. 60 min nach der letzten Buforminbehandlung wurde 1 IE Alt-Insulin/kg intravenös injiziert. Nach 3, 10 oder 20 min wurden die Tiere dekapiert. Im Serum des dabei aufgefangenen Blutes wurde die Insulinkonzentration bestimmt. Aus dem Vergleich der bei Kontrollen und behandelten Tieren zu den verschiedenen Zeiten ermittelten Werte wurden Rückschlüsse auf die Abfallgeschwindigkeit der Insulinkonzentration im Serum gezogen.

Bei Untersuchungen an diabetischen Ratten, die nach 16-stündiger Nüchternheit erfolgten, wurde bei jedem Tier 2 und 15 min nach intravenöser Injektion von 0,5 IE/kg Alt-Insulin der retrobulbäre Venenplexus punktiert und in dem dabei gewonnenen Blut die Seruminsulinkonzentration bestimmt.

Die Differenz zwischen beiden Werten wurde in Prozent des 2-Minuten-Wertes angegeben und als Maß für die Abfallgeschwindigkeit des injizierten Insulins benutzt.

2.4.1.5.

Änderung der l-Arabinosekonzentration im Blut und des l-Arabinoseverteilungsraumes unter dem Einfluß von Insulin.

An normalen 24 Std. nüchternen Tieren wurde der Einfluß von Insulin auf den Abfall der l-Arabinosekonzentration im Blut untersucht. Eine Stunde nach der letzten Buforminbehandlung erhielten die Ratten eine intravenöse Injektion von 2 g/kg l-Arabinose. 10 min später wurde Alt-Insulin (0,5 IE/kg, i.v.) injiziert. Unmittelbar vor, sowie 10 und 20 Minuten nach dieser Insulininjektion wurde den Tieren Blut zur Bestimmung der Arabinosekonzentration entnommen. Aus dem Vergleich der bei Kontrollen und behandelten Tieren zu verschiedenen Zeiten ermittelten Werte wurden Rückschlüsse auf die Abfallgeschwindigkeit der l-Arabinosekonzentration im Blut gezogen. Bei diabetischen Tieren wurde das l-Arabinoseverteilungsvolumen bestimmt. Bei Versuchsbeginn waren die Ratten 16 Std. nüchtern. 45 min nach der letzten Buformingabe wurden sie mit Inactin narkotisiert. Nach weiteren 15 min wurden die Ratten durch Unterbindung der

zu- und abführenden Nierengefäße beidseitig funktionell nephrektomiert. Nach Verschuß der Bauchdecken erfolgte 15 min später, d.h. 75 min nach Versuchsbeginn, die intravenöse Injektion von 1 g/kg l-Arabinose. Nach einer Verteilungszeit von 45 min (in der 120. Minute) erhielten die Tiere 0,5 IE/kg Alt-Insulin i.v. injiziert. 15 min danach (in der 135. Minute) wurden die Ratten dekapitiert und die l-Arabinosekonzentration im Serum des dabei aufgefangenen Blutes gemessen. Aus der injizierten Arabinosemenge und der Serumkonzentration wurde nach der Formel

$$\text{Arabinoseverteilungsvolumen (ml)} = \frac{\text{injizierte Arabinosemenge (mg/kg)}}{\text{Arabinosekonzentration im Serum (mg/ml)}}$$

das Arabinoseverteilungsvolumen (AVV) in ml errechnet und in % des Körpergewichtes ausgedrückt.

2.4.2.

Oxydation von ^{14}C -U-Glucose oder von ^{14}C -1-Palmitinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$

2.4.2.1.

^{14}C -U-Glucose

Versuche an normalen Tieren wurden im Rahmen eines intravenösen Glucosetoleranztests, d.h. nach Stimulation der Insulinabgabe durch Glucose, vorgenommen.

^{14}C -U-Glucose (13,3 $\mu\text{Ci/kg}$) wurde zusammen mit inaktiver Glucose (1,5 g/kg) 60 min nach der letzten Buforminapplikation intravenös injiziert. Zwischen der 5. und 22. Minute nach dieser Injektion, also während des exponentiellen Abfalls der Blutglucosekonzentration, wurde die ausgeatmete Kohlensäure gesammelt und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt.

Bei diabetischen Tieren wurde der Einfluß exogenen Insulins auf die Glucoseoxydation geprüft. Ihnen wurde ^{14}C -U-Glucose ohne Zusatz inaktiver Glucose ebenfalls 60 min nach der letzten Buforminbehandlung intravenös injiziert. 15 min später erhielten sie eine intravenöse Injektion von 0,5 IE/kg Alt-Insulin. Sofort anschließend wurde für 10 min die mit der Atemluft abgegebene $^{14}\text{CO}_2$ gesammelt. Zur Ermittlung der basalen Glucoseoxydation bei diabetischen Ratten, die kein Insulin erhielten, wurde die CO_2 -Sammelperiode auf 30 Minuten ausgedehnt.

2.4.2.2.

^{14}C -1-Palmitinsäure

Die Versuche wurden an normalen Tieren durchgeführt. ^{14}C -1-Palmitinsäure wurde 60 min nach der letzten Buforminbehandlung intravenös injiziert. Von der 5. bis zur 22. Minute nach diesem Zeitpunkt erfolgte die Sammlung der abgeatmeten $^{14}\text{CO}_2$. Vor Beginn und nach Beendigung der Sammelperiode wurde Blut zur Bestimmung der Konzentration der freien Fettsäuren und der Radioaktivität im Serum entnommen.

2.4.3. Gewebsuntersuchungen

2.4.3.1.

Einbau von ^{14}C -U-Glucose in das Zwerchfellglykogen

Der Einbau von ^{14}C -U-Glucose in das Zwerchfellglykogen wurde bei normalen Tieren nach Stimulation der endogenen Insulinabgabe durch Glucose, bei diabetischen Tieren unter dem Einfluß exogenen Insulins, bestimmt. 60 min nach der letzten Buformingabe wurde normalen Ratten ^{14}C -U-Glucose (13,3 $\mu\text{Ci/kg}$) zusammen mit inaktiver Glucose (1,5 g/kg) intravenös injiziert. Diabetische Tiere

erhielten zum gleichen Zeitpunkt nur die aktive Glucose und nach weiteren 15 min eine Injektion von 0,5 IE/kg Alt-Insulin.

25 min nach der Glucoseinjektion wurden die Tiere dekapitiert. Sofort anschließend wurden die Zwerchfelle herauspräpariert und zur Bestimmung des Glykogengehaltes sowie der eingebauten Radioaktivität weiterverarbeitet.

2.4.3.2.

Bestimmung der Lactatkonzentration in der Muskulatur

Diese Untersuchung erfolgte bei normalen Tieren 75 min nach der letzten Buforminapplikation. In Inactinnarkose wurde der Musculus quadriceps femoris freipräpariert und anschließend das Gewebe mit einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Aluminiumzange gefaßt („Gefrierstop“), entnommen und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.4.3.3.

Bestimmung der Hexokinaseaktivität in der Muskulatur

Die Hexokinaseaktivität wurde bei normalen Ratten im Musculus quadriceps femoris gemessen. 75 min nach der letzten Buforminbehandlung wurden die Tiere dekapitiert. Sofort danach wurde das Gewebe entnommen und zur Messung der Enzymaktivität weiterverarbeitet.

2.5.

BESTIMMUNGSMETHODEN

2.5.1.

Glucosebestimmung im Blut

0,1 ml Vollblut wurde in 1,0 ml 0,16%iger Uranylacetatlösung enteiweißt. In dem bei 3000 Upm abzentrifugierten Überstand wurde die Glucosekonzentration in Anlehnung an das von HUGGET und NIXON 1957 veröffentlichte Verfahren bestimmt (Biochemica Testkombination, Boehringer-Mannheim G.m.b.H.).

Das Verfahren beruht auf der Oxydation von Glucose in Gegenwart von O_2 durch Glucoseoxydase. Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxyd wird durch Peroxydase bei Anwesenheit eines Wasserstoffdonators in H_2O_2 übergeführt. Zugleich wird der farblose Wasserstoffdonator, O-Dianisidinhydrochlorid zu einem rotbraun gefärbten Chinon oxydiert. Dieses absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 436 \text{ m}\mu$.

Der von der Firma Boehringer gelieferte Ansatz enthält die beiden Enzyme Glucoseoxydase und Peroxydase zusammen mit primärem und sekundärem Phosphat als Puffersubstanz. Nach Auflösung dieses Puffer-Enzym-Gemisches in destilliertem Wasser entsprechend der gegebenen Vorschrift beträgt der pH-Wert 7,0. Nach Zusatz des Chromogens, das gesondert in aqua dest. gelöst wird, werden 5 ml dieses Glucose-Reagens zu 0,2 ml des enteiweißten Überstandes hinzupipettiert. 35 min später wird die Intensität des entstandenen Farbstoffes mit einem Spectrophotometer gemessen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Gerät der Firma Beckman, Modell DB, verwendet. Unter Berücksichtigung eines Leerwertes und eines Standards (entsprechend einer Blutzuckerkonzentration von 100 mg %) wurde der Glucosegehalt der untersuchten Blutproben errechnet und in der Dimension $\text{mg \%}$ angegeben.

2.5.2.

Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum

Die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum wurde nach der Methode von DUNCOMBE (1963) gemessen.

Unveresterte Fettsäuren bilden mit Kupfer Salze, die in Wasser nahezu unlöslich sind, sich dagegen in Chloroform lösen. Diese Salze bilden mit substituierten Carbaminaten (Diaethyldithiocarbamat) gelb gefärbte Anlagerungsverbindungen, deren Absorptionsmaximum bei 440 m μ liegt.

Technische Durchführung:

0,2 ml Serum und 2 ml Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 6,2) wurden in ein Schliff-zentrifugenglas pipettiert, in dem bereits 6 ml Chloroform vorgelegt waren. Danach wurde 10 min geschüttelt und nach Zentrifugation die obere, wäßrige Phase abgesaugt. Danach wurde 2,0 ml einer Lösung zupipettiert, die zur Hälfte aus 6,45%iger Cu (NO₃)₂ · 3H₂O Lösung, zu 45 % aus 1,0 M Triäthanolamin-Lösung und zu 5 % aus 1,0 N Essigsäure bestand. Nach 10 minütigem Schütteln wurde erneut zentrifugiert und die wäßrige Phase abgesaugt. Zur Entfernung des restlichen Wassers wurde das zurückbleibende Chloroform filtriert. Je 3 ml Filtrat wurden anschließend in ein Reagenzglas pipettiert, das 1,0 ml 0,1%iger Diaethyldithiocarbamat-Lösung in Alkohol enthielt. Nach Umschütteln wurde die Intensität des entstandenen braungelben Farbstoffes mit einem Spectrophotometer (Modell DB der Firma Beckman) gegen einen Reagentienleerwert bei $\lambda = 440$ m μ gemessen. Als Standard diente Palmitinsäure, die in einer Menge von 0,2 μ mol in 6 ml Chloroform vorgelegt wurde. Dies entsprach 0,2 ml eines Serums mit der Konzentration 1 mval/l. Unter Berücksichtigung dieses Standards wurde die Fettsäurekonzentration der Meßwerte in mval/l Serum errechnet.

2.5.3.

Bestimmung der l-Arabinosekonzentration im Blut oder Serum

Die Bestimmung erfolgte nach dem Verfahren von MEJBAUM (1939). Die Methode beruht darauf, daß Pentosen beim Kochen in Säuren mit Orcin einen grünen Farbstoff bilden, dessen Intensität spectrophotometrisch gemessen werden kann.

0,1 ml Blut (oder Serum) wurden in 1,0 ml 2,85%iger Perchlorsäure enteiweißt. Nach Abzentrifugieren wurde 0,1 ml des Überstandes mit destilliertem Wasser 1 : 10 verdünnt. Anschließend wurde 1,0 ml einer Lösung zugegeben, die 1,0 % Orcin und 0,1 % FeCl₃ in konz. HCl enthielt. Anschließend wurden die Proben 20 min lang auf 100°C (im Wasserbad) erhitzt. Nach Zugabe von 2,0 ml Wasser wurde die Intensität des entstandenen grünen Farbstoffes bei $\lambda = 580$ m μ mit einem Spectralphotometer (Modell DB der Firma Beckman) gemessen. In gleicher Weise wie die Meßwerte wurde eine Eichreihe behandelt, deren Arabinosegehalt Blutkonzentrationen zwischen 0 und 600 mg % entsprach. Da auch Glucose in geringem Umfang mit Orcin unter Bildung eines grünlichen Farbstoffes reagiert, muß die Glucosekonzentration der Meßproben bei der Berechnung der Arabinosekonzentration berücksichtigt werden. Hierzu wurde die Farbbildung einer Glucoseeichreihe gemessen, deren Gehalt dem Bereich der im Blut gemessenen Konzentrationen (0 - 400 mg %) umfaßte. Aus den gleichzeitig gemessenen Blutzuckerkonzentrationen konnte unter Berücksichtigung dieser Eichreihe eine Korrektur der Arabinosekonzentrationen um die durch die Glucose bedingte, zusätzliche Farbbildung erfolgen. Durch Vergleich der korrigierten Meßwerte mit der Arabinoseeichkurve wurde die Konzentration im Blut bzw. Serum berechnet und in mg % (mg/ml) angegeben.

2.5.4.

Bestimmung der Radioaktivität im Blut oder Serum

Der ¹⁴C-Gehalt im Blut oder Serum wurde nach Injektion von ¹⁴C-U-Glucose oder von ¹⁴C-1-Palmitinsäure bestimmt. Hierzu wurden entweder 0,05 oder 0,1 ml Serum

oder 0,2 ml des Überstandes, der nach Enteiweißung von 0,1 ml Blut in 1,0 ml 2,85%iger Perchlorsäure durch Abzentrifugieren gewonnen wurde, in Plastikzählgefäße der Fa. Packard pipettiert, die bereits 2 ml Methanol enthielten. Anschließend wurden 16 ml einer wasserlöslichen Scintillationsflüssigkeit¹ hinzugegeben. Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler der Fa. Packard, Modell TRI-CARB, gemessen. Unter Berücksichtigung der Zählhausbeute, die mit einem externen Standard ermittelt wurde, und der Verdünnungsfaktoren wurde die Aktivität im Blut (Serum) in

$$\frac{10^3 \text{ zpm}}{\text{ml}}$$

errechnet.

¹ 100 g Naphthalin (rein, weiß, sublimiert), 10 g 2,5-Diphenyloxazol (Scintillation grade) (= PPO) und 0,25 g 2,2'-p-Phenylen-bis (5-phenyloxazol) (=POPOP) wurden mit Dioxan (reinst) ad 1000 ml aufgefüllt.

2.5.5.

Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum

Die Insulinkonzentration im Serum wurde nach dem Verfahren von MORGAN und LAZAROW (1962, 1963) sowie MORGAN, SORENSON und LAZAROW (1964) bestimmt. Das Prinzip der radioimmunologischen Insulinbestimmung nach der Doppelantikörpermethode beruht auf einer Bindung des Hormons an einen spezifischen Antikörper und nachfolgender Trennung des gebundenen und freien Insulins durch eine zweite Immunreaktion, bei der der Antigen-Antikörperkomplex durch einen gegen das Insulinantiserum gerichteten zweiten Antikörper präzipitiert wird. Hierfür ist eine definierte Menge ^{125}J -Insulin erforderlich, das bei der Bindung an den Insulin-Antikörper mit dem im Ansatz enthaltenen unmarkierten Hormon konkurriert. Dies führt dazu, daß bei steigenden Konzentrationen freien Insulins weniger radioaktives Hormon gebunden wird – und umgekehrt. Die Herstellung der Insulinantikörper erfolgt durch Immunisierung von Meerschweinchen mit kristallinem Rinderinsulin. Antiserum zur Präzipitation des löslichen Antigen-Antikörperkomplexes wird durch Immunisierung von Kaninchen mit Meerschweinchenserum gewonnen. Da Ratteninsulin ebenfalls mit Rinderinsulin-Antikörpern reagiert, ist es möglich, das Hormon dieser Tierart unter Verwendung von ^{125}J -Rinderinsulin, einem Antirinderinsulinserum und kristallinem Rinderinsulin als Eichsubstanz zu bestimmen.

Technische Ausführung:

Die Insulinmessung erfolgte als Doppelbestimmung in Serumproben von 0,1 ml. Bis zur Aufarbeitung wurden sie bei -20°C in 7,0 ml Plastikzentrifugenröhrchen aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden sie im Eisbad 1 : 5 mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer¹ verdünnt und anschließend folgende Reagentien hinzugegeben: 0,05 ml ^{125}J -Insulinlösung (2,7 μE Insulin, 5 n Ci ^{125}J)², 0,05 ml Insulinantiserum³. Ebenso wurden gleiche Volumina einer Rinderinsulineichreihe behandelt, deren Konzentration von 0 bis 512 $\mu\text{E}/\text{ml}$ reichte. Die Proben wurden umgeschüttelt und 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden im Eisbad 0,05 ml Antimeerschweinchenserum⁴ (eigene Herstellung) und 0,05 ml normales Meerschweinchenserum⁵ hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 16 - 24 Stunden bei 4°C war ein Präzipitat entstanden, das den Insulin-Antiinsulin-komplex enthielt. Der Überstand wurde abzentrifugiert (3000 Upm, Zimmertemperatur) und dekantiert. Anschließend wurde das Präzipitat mit 0,5 ml 1%igem Rinderserumalbuminboratpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Waschflüssigkeit wurde dem Überstand hinzugefügt. Die Radioaktivität von Präzipitat und Überstand wurde in einem γ -Scintillationszähler der Firma Nuclear Chicago gemessen und der im Präzipitat enthaltene Anteil als Prozentsatz der Gesamtaktivität errechnet. Durch Auftragen der gebundenen Radioaktivität der Eichwerte gegenüber der eingesetzten Insulinkonzentration ergab sich auf semilogarithmischem Papier eine Eichkurve, von der der Insulingehalt der Versuchsproben abgelesen werden konnte. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Konzentration des radioimmunologisch meßbaren Insulins in $\mu\text{E}/\text{ml}$ Serum angegeben.

¹ 8,25 g Borsäure, 2,7 g NaOH, 100 mg Thimerosal (Methiolat), 50,0 g Rinderserumalbumin (reinst), aqua dest. ad 1000,0, pH 7,4.

² ^{125}J -Rinderinsulin (0,1 μg = 2,7 mE, 5 μCi , 5 ml, Radiochemical Center, Amersham, England), 10-fache Verdünnung mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer.

³ Antirinderinsulin- γ -Globulin vom Meerschweinchen (eigene Herstellung), Verdünnung 1 : 6000 mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer unter Zusatz von 5,4 % EDTA.

⁴ Präzipitierendes Antimeerschweinchenserum vom Kaninchen, eigene Herstellung, unverdünnt.

⁵ Normales Meerschweinchenserum, 1 : 200 mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer verdünnt.

2.5.6

Bestimmung von $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft

Zur Bestimmung des $^{14}\text{CO}_2$ -Gehaltes der Ausatemungsluft nach i.v. Injektion von ^{14}C -U-Glucose oder ^{14}C -1-Palmitinsäure wurden die Ratten in verschlossene Glasgefäße (Witt'sche Töpfe) gesetzt, durch die mit konstanter Geschwindigkeit Luft (1,5 - 2 l/min) gesaugt wurde. Die abgesaugte Luft wurde zur Bindung der CO_2 durch 100,0 ml einer 12%igen Aethanolaminlösung in Methanol geleitet. Nach Versuchsende wurde der verdunstete Methanolanteil ersetzt. Anschließend wurden jeweils 4 ml der Lösung zur Radioaktivitätsmessung entnommen und in Plastikzählgefäße der Firma Packard, in denen bereits 1,0 ml Methanol vorgelegt war, pipettiert. Nach Zugabe von 15,0 ml einer wasserlöslichen Scintillationsflüssigkeit wurde die in den Proben enthaltene Radioaktivität in einem Flüssigkeits-scintillationszähler der Firma Packard (Modell TRI-CARB) bestimmt. Unter Berücksichtigung der mit Hilfe eines externen Standards ermittelten Zählausbeute sowie der Verdünnungsfaktoren und des jeweiligen Tiergewichtes wurde hieraus die abgeatmete radioaktive Kohlensäure in der Dimension

$$\frac{10^3 \text{ zpm}}{\text{kg}}$$

errechnet.

2.5.7.

Bestimmung der Pyruvatkonzentration im Blut

Die Pyruvatkonzentration im Blut wurde im optischen Test nach den Angaben von BÜCHER, CZOK, LAMPRECHT und LATZKO (1962) (Biochemica Test-Kombination, Boehringer-Mannheim G.m.b.H.) bestimmt.

Prinzip:

Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion von Pyruvat mit Hilfe von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Lactat und NAD. Mit einem Spectralphotometer kann die Abnahme der durch $\text{NADH} + \text{H}^+$ bedingten Absorption im UV-Bereich verfolgt werden.

Technische Durchführung:

4,0 ml Blut wurden nach der Entnahme sofort in 4,0 ml 0,6 N Perchlorsäure enteiweißt. Nach Zentrifugation wurden 3,0 ml des Überstandes durch Zugabe von 1,0 ml 2,2 M K_2HPO_4 -Lösung im Eisbad neutralisiert. Nach 10 min wurden die Proben auf 25°C erwärmt und das ausgefallene KClO_4 abzentrifugiert. 2,0 ml des Überstandes wurden zusammen mit 0,05 ml einer 0,012 M $\text{NADH} + \text{H}^+$ -Lösung in eine Küvette pipettiert. Nach Mischung mit einem Plastikspatel wurde sofort bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ die Absorption bestimmt. Danach wurden 0,05 ml einer Lactat-dehydrogenasesuspension (0,75 mg/ml) hinzugefügt und umgerührt. Nach 5 min wurde erneut die Absorption gemessen. Aus ihrem Abfall wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren, der Spontanoxydation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ ohne Pyruvatzusatz (= Leerwert) und der spezifischen Extinktion von $\text{NADH} + \text{H}^+$ ($\epsilon = 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$) die Pyruvatkonzentration im Blut errechnet und in der Dimension mg % angegeben.

2.5.8.

Bestimmung der Lactatkonzentration im Blut und in der Skelettmuskulatur

Die Lactatkonzentration im Blut und in der Muskulatur wurde im optischen Test nach den Angaben von HOHORST (1962) gemessen. Prinzip: Lactat wird durch Lactatdehydrogenase mit Hilfe von NAD zu Pyruvat oxydiert, wobei in äquivalenten Mengen $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht, dessen Absorption spectrophotometrisch im UV-Bereich bestimmt werden kann. Da das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite des Lactats liegt, müssen die entstehenden Protonen und das Pyruvat aus der Reaktion entfernt werden: die H^+ -Ionen werden durch ein alkalisches Reaktionsmedium abgefangen; durch Zusatz von Hydrazin wird Pyruvat als Pyruvathydrazon gebunden.

Technische Durchführung:

2.5.8.1.

Bestimmung im Blut

0,2 ml Blut wurden sofort nach der Entnahme durch Zusatz von 0,2 ml 0,6 N Perchlorsäure enteiweißt. Nach Abzentrifugieren wurde 0,1 ml des Überstandes in ein Reagenzglas pipettiert, das bereits 2,0 ml eines 0,5 M Glycinpuffers (pH 9,0) mit einem 0,4 M Hydrazinzusatz enthält. Anschließend wurden 0,03 ml einer Lactatdehydrogenasesuspension (2 mg/ml) und 0,2 ml einer 0,027 M NAD-Lösung hinzugegeben. Nach guter Durchmischung wurden die Proben eine Stunde bei 25°C stehengelassen. Dann wurde die Absorption bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ mit einem Spectralphotometer (Modell DB, Firma Beckmann) gemessen. Zur Bestimmung des Reagentienleerwertes diente eine Probe, die statt des enteiweißten Überstandes 0,1 ml Perchlorsäure enthielt. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen Meß- und Leerwert wurde unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktion von $\text{NADH} + \text{H}^+$ bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 6,3 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) und der Verdünnungsfaktoren die Lactatkonzentration im Blut errechnet und in der Dimension mg % angegeben.

2.5.8.2.

Bestimmung in der Muskulatur

Die durch „Gefrierstop“ entnommenen Muskelproben wurden unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Von jeder Probe wurden etwa 1000 mg abgewogen und mit 3,5%iger Perchlorsäure im Verhältnis 1 : 4 (Gewicht/Gesamtflüssigkeitsvolumen) eine Minute lang mit einem „Ultra-Turrax“ im Eisbad homogenisiert. Der Überstand wurde 10 min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge bei 20.000 Upm abgefahren und anschließend dekantiert. 0,1 ml dieses Überstandes wurden zur Lactatbestimmung verwendet, die in gleicher Weise, wie unter 2.5.8.1. angegeben, erfolgte. Unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktion von $\text{NADH} + \text{H}^+$, der verschiedenen Verdünnungsfaktoren und des Wassergehaltes der Muskulatur, der einheitlich mit 75 % angenommen wurde, konnte die Lactatkonzentration des Gewebes errechnet und in der Dimension $\mu\text{mol/g FG}$ angegeben werden.

2.5.9.

Bestimmung des Zwerchfellglykogens und seiner spezifischen Aktivität nach Injektion von ^{14}C -U-Glucose

Die Aufarbeitung des Gewebes und die Bestimmung des darin enthaltenen Glykogens erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von BALZER und PALM (1962). Sofort nach Tötung der Tiere wurden die Zwerchfelle herauspräpariert, mit 0,9%iger NaCl abgespült, auf Filterpapier getrocknet, gewogen und in 3,0 ml heiße, 30%ige KOH hineingegeben. Nach Auflösen des Gewebes wurde das Volumen mit aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und anschließend das darin enthaltene Glykogen durch Zugabe von 12,5 ml absolutem Aethanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend wurde das ausgefallene Glykogen 3 x gewaschen und jeweils erneut mit dem 1,25fachen Volumen Aethanol präzipitiert. Nach Entfernung des letzten Überstandes wurde das Glykogen mit 2,0 ml 1 N HCl durch Erhitzen auf 100°C (30 min) hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde mit 1,0 ml 2 N NaOH neutralisiert und mit aqua dest. auf 5,0 ml aufgefüllt. In je 0,5 ml dieser Lösung wurde der Glucosegehalt enzymatisch bestimmt (siehe 2.5.1.) und die Radioaktivität (^{14}C) mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen (Einzelheiten über die Szintillationsflüssigkeit und die Korrektur der Zählausbeute siehe unter 2.5.4.). Unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungsfaktoren und des Zwerchfellgewichtes wurde der Glykogengehalt des Gewebes als Glucoseäquivalent in der Dimension $\mu\text{g}/100 \text{ mg FG}$ errechnet. Die im Glykogen enthaltene Radioaktivität wurde einerseits auf das Feuchtgewicht der Muskulatur bezogen und als

$$\frac{\text{zpm}}{100 \text{ mg FG}}$$

angegeben. Andererseits wurde die spezifische Aktivität des in der Muskulatur enthaltenen Glykogens errechnet. Ihre Angabe erfolgte in der Dimension

$$\frac{10^3 \text{ zpm}}{\text{mg Glykogen}}$$

2.5.10.

Bestimmung der Hexokinaseaktivität in der Skelettmuskulatur

Die Aktivität dieses Enzyms wurde in dem unfraktionierten Gesamthomogenat nach den Angaben von SALAS, VINUELA und SOLS (1963) bestimmt. Die sofort nach Tötung der Tiere entnommene Muskulatur wurde von anhaftendem Blut und Fett befreit, gewogen und 1 min im Eisbad mit einem „Ultra-Turrax“ in 5,0 ml eines 0,1 M Tris-Puffers (pH 7,4) homogenisiert, der außerdem 0,001 M EDTA und 0,001 M β -Mercaptoethanol enthielt. In dem 30 min bei $1000 \times g$ abgefahrenen Homogenat wurde die Hexokinaseaktivität aufgrund der Bildung von Glucose-6-phosphat aus ATP und Glucose und sofortiger Umsetzung mit NADP zu 6-Phosphogluconat + NADPH + H^+ mit einem Spectralphotometer der Firma Zeiss (Typ PMQ II mit Küvettenautomatik und Punktdrucker) fortlaufend registriert. Die Wellenlänge betrug $\lambda = 340 \text{ m}\mu$. Der Meßpuffer enthielt in einem Gesamtvolumen von 3,155 ml 0,5 M Glucose, 0,25 M NADP, 5,0 M ATP, 5,0 mM MgCl_2 , 5,0 mM β -Mercaptoethanol und 50,0 mM Tris (pH 7,4). Diese Angaben beziehen sich auf die Endkonzentration. Außerdem enthielt der Puffer 0,005 ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase/Ansatz (Kristallsuspension Boehringer, 10 mg/ml). Die Reaktion wurde jeweils durch Substratzugabe gestartet und 5 min lang verfolgt. Aus dem Anstieg der Absorption wurde die Enzymaktivität unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktion von NADPH + H^+ ($\epsilon = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ bei $\lambda = 340 \text{ m}\mu$), des Küvettenvolumens und der übrigen Verdünnungsfaktoren einschließlich des Wassergehaltes der Muskulatur ($= 75 \%$), sowie des Feuchtgewichtes und der Reaktionszeit in der Dimension

$$\frac{\text{n mol Glucose-6-phosphat}}{\text{g FG min}} \quad \text{angegeben.}$$

Außerdem wurde der Eiweißgehalt im Muskelhomogenat bestimmt und die Hexokinase-aktivität in

$$\frac{n\text{-mol Gluc-6-ph}}{\text{mg Prot} \cdot \text{min}}$$

angegeben.

2.5.10.1.

Proteinbestimmung im Muskelhomogenat

Die Eiweißbestimmung im Muskelhomogenat erfolgte nach der Methode von LOWRY, ROSENBROUGH, FARR und RANDALL (1951). Hierzu wurde das Homogenat zunächst mit aqua dest. 1 : 100 verdünnt. In 1,0 ml dieser Lösung sowie gleichen Volumina einer Eichreihe mit Konzentrationen zwischen 0 und 150 µg/ml Rinderserumalbumin wurden 5,0 ml alkalische CuSO_4 -Lösung hinzupipettiert. Sie wurde jeweils frisch aus 50 Vol. 2%iger Na_2CO_3 -Lösung in $\frac{n}{10}$ NaOH, 0,5 Vol.

1%iger $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung und 0,5 Vol. 2%iger Kaliumtartrat-Lösung zubereitet. Nach 10 min wurden 0,5 ml Phenolreagenz (nach FOLIN und CIOCALTEU) zugesetzt, das kurz zuvor mit aqua dest. 1 : 1 verdünnt worden war. 30 min später wurde die Intensität des entstandenen blauen Farbstoffes bei $\lambda = 750 \text{ nm}$ spectrophotometrisch bestimmt. Aus den Extinktionen der Meß- und Eichwerte wurden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Eiweiß-Konzentrationen in

$$\frac{\text{mg Protein}}{n \text{ Homogenat}}$$

errechnet.

2.6.

STATISTIK

Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte (s) und Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) nach folgenden Formel berechnet:

$$1) \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (n = \text{Tierzahl/Gruppe})$$

$$2) \quad s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \cdot \sum x}{n - 1}}$$

$$3) \quad s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Auf den Abbildungen und Tabellen wurden die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen angegeben. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurde nicht der üblicherweise verwendete T-Test benutzt, da in einigen Fällen die Streuungen der zu vergleichenden Gruppen zu stark voneinander abwichen. Unter diesen Umständen, d.h. beim Vorliegen inhomogener Varianzen (S^2), darf eine Berechnung nach diesem Verfahren nicht erfolgen. Um zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurden daher bei allen Versuchen die Signifikanzen nach dem U-Test berechnet (WEBER, 1967). Dieses Verfahren erlaubt den Vergleich von Gruppen mit unterschiedlicher Verteilung.

In dem auf Abb. 1 dargestellten Versuch wurde durch eine Regressionsanalyse (s. CAVALLI – SFORZA, 1969) geprüft, ob die zwischen der 3. und 30. min nach i.v. Injektion von 1,5 g/kg Glucose gemessenen Blutzuckerkonzentrationen bei logarithmischer Transformation die Annahme eines linearen Abfalls der Glucose im Blut rechtfertigen. Alle Berechnungen wurden nach ausgearbeiteten Programmen mit einer elektronischen Rechenmaschine (Typ IBM 300) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1.

EINFLUSS VON BUFORMIN IN NIEDRIGER DOSIERUNG AUF DIE GLUCOSEKONZENTRATION IM BLUT NÜCHTERNER NORMALER UND DIABETISCHER RATTEN

3.1.1.

Versuche an normalen Tieren

Die in der Literatur angegebene Buformindosis, die bei Ratten nach oraler Gabe eine 30 - 50%ige Blutzuckersenkung hervorruft, beträgt 300 mg/kg (BECKMANN, 1968). Wie die erste Tabelle zeigt, führen auch 150 mg/kg noch zu einer signifikanten Blutzuckersenkung gegenüber den Kontrollen. Unter dem Einfluß von 100 mg/kg wurden dagegen keine Unterschiede gegenüber unbehandelten Tieren gemessen.

Für die im folgenden durchgeführten Versuche wurde eine noch niedrigere Dosierung gewählt. Mit 35 mg/kg lag sie nun fast 90 % niedriger als die zur sicheren Erzeugung einer schweren Hypoglykämie erforderliche Dosis von 300 mg/kg. Eine zweimalige tägliche Applikation dieser niedrigen Dosis führte selbst nach einer 2-, 3- oder 12-tägigen Behandlungsdauer nicht oder zu einer nur geringfügigen Erniedrigung der Glucosekonzentration im Blut. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Blut durch Dekapitation, Punktion des retrobulbären Venenplexus oder der Aorta abdominalis gewonnen wurde (Tabelle 2). Auch nach 12-tägiger Behandlung mit 2 x 70 mg/kg/Tag (per os) war die Blutzuckerkonzentration nüchterner Tiere nicht niedriger als die der Kontrollen (Abb. 2).

Glucosekonzentration im Blut 16 Std nüchterner Ratten nach einmaliger oraler Gabe von Buformin

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Sig. < Ko.: (—) $p > 0,05$, (+) $p < 0,05$ (einseitig); () = n; Blutentnahme: Vorwert und 90 min-Abnahme: Punktion des retrobulbären Venenplexus, 180 min-Abnahme: Dekapitation].

	Blutglucose (% des Ausgangswertes)	
	nach 90 min	nach 180 min
Kontrollen (20)	82,9 $\pm$ 1,4	107,1 $\pm$ 2,1
Buformin 100 mg/kg (10)	84,5 $\pm$ 3,7	105,3 $\pm$ 5,3
Sig. < Ko.	(—)	(—)
Buformin 150 mg/kg (10)	71,7 $\pm$ 5,6	76,1 $\pm$ 13,4
Sig.<Ko.	(+)	(+)

Tabelle 1

Einfluß einer chronischen Behandlung mit Buformin (2 x 35 mg/kg/Tag, p.o.) auf die Glucosekonzentration im Blut 16 Std nüchterner Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Sig. < Ko.: (-) $p > 0,05$, (+) $p < 0,05$ (einseitig); () = n; Blutentnahme 60, 75 oder 120 min nach der letzten Applikation; Blutgewinnung durch Punktion des retrobulbären Venenplexus (r Vp), der Aorta (Ao.) oder Dekapitation (Dek.)].

Tag	Blutglucose (mg %)			min n. Applik.	Blutgewinnung
	Kontrollen	< Ko	Buformin		
2.	85,0 $\pm$ 2,3 (10)	(+)	78,6 $\pm$ 2,5 (10)	75	Ao.
	86,9 $\pm$ 2,6 (10)	(-)	84,5 $\pm$ 3,2 (10)	75	Ao.
	75,4 $\pm$ 3,5 (14)	(+)	66,5 $\pm$ 2,4 (16)	75	Ao.
	45,7 $\pm$ 2,9 (10)	(+)	38,5 $\pm$ 1,8 (10)	75	Dek.
3.	63,2 $\pm$ 1,1 (15)	(-)	61,2 $\pm$ 1,6 (15)	120	Dek.
	54,8 $\pm$ 1,0 (14)	(-)	52,6 $\pm$ 1,2 (17)	120	Ao.
12.	61,8 $\pm$ 0,9 (30)	(-)	59,1 $\pm$ 1,6 (30)	60	r Vp.
	80,1 $\pm$ 1,4 (20)	(+)	74,4 $\pm$ 2,0 (19)	75	r Vp.

Tabelle 2

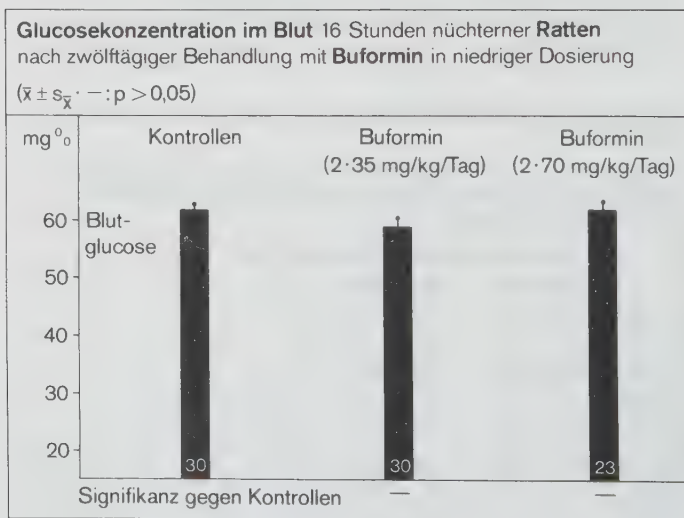


Abbildung 2

3.1.2. Versuche an diabetischen Tieren

Auch bei diabetischen Tieren hatte eine mehrtägige Behandlung mit 2×35 (2×70) mg/kg/Tag keine Erniedrigung der in nüchternem Zustand gemessenen Glucosekonzentration im Blut zur Folge (Tabelle 3).

Einfluß einer chronischen Behandlung mit Buformin auf die Glucosekonzentration im Blut 16 Std nüchterner diabetischer¹ Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; sig. < Ko.: (—) $p > 0,05$ (einseitig); () = n; Blutentnahme 75' nach der letzten Applikation; Blutgewinnung durch Punktion des retrobulbären Venenplexus;
¹Alloxandibetes (Allox.): 80 mg/kg i.v., 9 Tage; Streptozotocindibetes (Strepto.): 100 mg/kg, i.v., 10 Tage].

Tag	Blutglucose (mg %)				Diabetes
	Kontrollen	17,5 mg Buformin/kg, p.o., morgens u. abends	35	70	
2.	281,2 $\pm$ 16,1 (10)	257,8 $\pm$ 14,2 (10) (—)	284,7 $\pm$ 15,3 (6) (—)	276,8 $\pm$ 22,9 (7) (—)	Allox.
5.	276,6 $\pm$ 9,2 (20)		313,0 $\pm$ 22,5 (15) (—)		Allox.
	391,5 $\pm$ 8,3 (13)		395,5 $\pm$ 8,0 (16) (—)		Allox.
10.	232,5 $\pm$ 18,0 (13)		205,9 $\pm$ 12,9 (12) (—)		Strepto.

Tabelle 3

3.2. BEEINFLUSSUNG DER GLUCOSETOLERANZ DURCH EINE BEHANDLUNG MIT BUFORMIN

Während bei nüchternen Tieren keine Beeinflussung der Blutglucose beobachtet wurde, war die Glucosetoleranz nach Vorbehandlung mit 2×35 oder 2×70 mg Buformin/kg/Tag verbessert. Nach i.v. Injektion von Glucose fiel die Blutzuckerkonzentration beschleunigt ab. Als Ausdruck dessen nahm die Eliminationskonstante k_G zu (Tab. 4, Abb. 3). Dieser Effekt war in einigen Fällen dosisabhängig, da eine Vorbehandlung mit 2×70 mg/kg/Tag eine stärkere Steigerung des k_G -Wertes verursachte als die Applikation der niedrigeren Dosis. Nach Behandlung mit $2 \times 17,5$ mg/kg/Tag wurde in einem Fall ebenfalls eine Verbesserung der Glucosetoleranz festgestellt. Bei einem zweiten Experiment war dagegen trotz längerer Behandlungsdauer keine Wirkung mit dieser Dosis zu erzielen. Mit Ausnahme der Tatsache, daß nach einmaliger Vorbehandlung auch mit 70 mg/kg der Effekt nicht sicher reproduzierbar war, hatte im übrigen die Dauer der Vorbehandlung keinen wesentlichen Einfluß mehr auf die Verbesserung der Glucosetoleranz. Zwischen dem 2. und 14. Tag wurde, von 2 Ausnahmen abgesehen, ein durchschnittlicher Anstieg des k_G -Wertes gegenüber den Kontrollen um 20 - 35 % nach Applikation von 2×35 mg Buformin/kg/Tag beobachtet. Während dieses Zeitraumes, in dem mit einer relativ gleichmäßigen und dauerhaften Verbesserung der Glucosetoleranz gerechnet werden konnte, wurden alle weiteren Versuche zur Aufklärung dieses Effektes durchgeführt. Im allgemeinen geschah dies am 2. Tag nach Behandlungsbeginn. Aus versuchstechnischen Gründen

wurden die Experimente aber auch nach längerer Behandlungsdauer vorgenommen, so z.B., wenn an demselben Tierkollektiv verschiedene Fragen untersucht werden sollten.

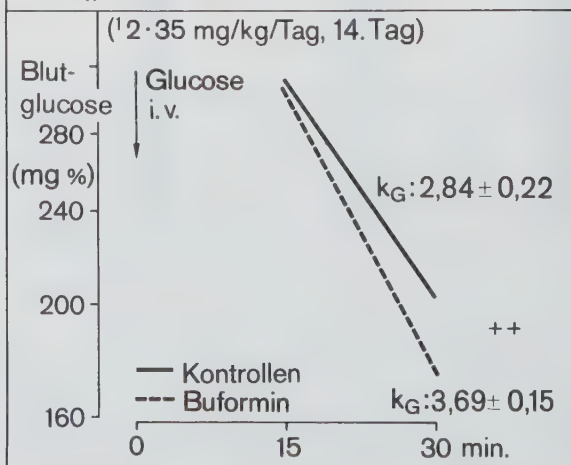
Einfluß der Dauer einer Buforminbehandlung auf die Steigerung der Glucoseelimination aus dem Blut 16 Std nüchterner Ratten

[i.v. Glucosebelastung: 1,5 g/kg; Statistik: (–) : $p > 0,05$, (+) : $p < 0,05$, (++) : $p < 0,02$]

Tag	Anstieg des k_G -Wertes in % der Kontrollen			Tiere pro Gruppe
	17,5 mg Buformin/kg, p.o., morgens und abends	35	70	
1.	–	8,4 (–)	9,6 (–)	20
	–	49,1 (++)	46,0 (++)	12
2.	–	18,0 (+)	–	11
	20,8 (++)	27,4 (++)	54,3 (++)	9
3.	–	20,9 (+)	23,3 (+)	20
5.	–	29,4 (+)	–	9
	–	70,2 (++)	–	9
7.	–	38,0 (+)	–	17
	–	81,6 (++)	–	20
10.	–	21,1 (++)	26,9 (++)	30
14.	0,6 (–)	30,0 (++)	–	17

Tabelle 4

Einfluß einer chronischen Behandlung mit Buformin¹ auf die Elimination von Glucose aus dem Blut nach i.v. Injektion (1,5 g/kg) bei 16 Stunden nüchternen Ratten.
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Signifikanz: ++ : $p < 0,02$)



3.3.

BEEINFLUSSUNG DER ELIMINATION VON ^{14}C -U-GLUCOSE AUS DEM BLUT ODER SERUM DURCH VORBEHANDLUNG MIT BUFORMIN

Zur Frage nach der Ursache der verbesserten Glucosetoleranz wurden zunächst Experimente durchgeführt, in denen inaktive zusammen mit radioaktiv markierter Glucose (^{14}C -U-Glucose) intravenös injiziert wurde.

Die Elimination der Radioaktivität aus dem Blut war unter diesen Bedingungen nach Vorbehandlung mit Buformin um etwa den gleichen Prozentsatz gesteigert, wie der der Abfall der Blutzuckerkonzentration (Abb. 4). Auch hierbei ergab sich, daß die Dauer der Vorbehandlung keinen wesentlichen Einfluß auf die Steigerung des Eliminationskoeffizienten k_2 hatte (Tab. 5).

Diese Versuchsanordnung erlaubt zwar keine weitergehenden Schlüsse, denn die spezifische Aktivität der Glucose im Blut wurde nicht bestimmt. Da das Verhältnis zwischen Gesamtradioaktivität und Glucosekonzentration im Blut jedoch während der Beobachtungszeit nahezu gleich blieb und zwischen behandelten und unbehandelten Tieren keine Unterschiede auftraten, wurde dieser Befund als Hinweis darauf betrachtet, daß die Verbesserung der Glucosetoleranz vorwiegend auf einer Steigerung des peripheren Glucoseverbrauches beruhen dürfte und nicht auf einer Hemmung der hepatischen Glucoseabgabe. In diesem Falle dürfte trotz eines verstärkten Abfalles der Glucosekonzentration im Blut die Elimination der Radioaktivität nicht beschleunigt sein, der Quotient zwischen Aktivität und Glucosekonzentration im Blut müßte ansteigen.

Gegen eine Gluconeogenesehemmung durch die bei diesen Versuchen verwendeten niedrigen Buformindosen sprach auch, daß Leberschnitte von chronisch mit dem Biguanid behandelten Tieren in vitro weder aus endogenem noch aus zugesetztem Pyruvat vermindert Glucose bilden. Auch bei Zusatz von Buformin zum Inkubationsmedium wurde eine deutliche Hemmung der Gluconeogenese erst bei Konzentrationen über 10^{-4} M beobachtet (JANGAARD, PEREIRA und PINSON, 1968; LOSERT, LOGE und SCHILLINGER, 1969). Aufgrund der Ergebnisse von BECKMANN (1965) kann mit derartig hohen Konzentrationen nach Gabe von 35 mg/kg nicht gerechnet werden. Niedrigere Konzentrationen ($2,55 \cdot 10^{-5}$ M) beeinflussten nach den Untersuchungen von SÖLING, KNEER, MOOSHAGEN, SCUTELLA und CREUTZFELDT (1967) die Nettoglucoseabgabe isoliert perfundierter Lebern nicht.

Einfluß der Dauer einer Buforminbehandlung (2×35 mg/kg/Tag, p.o.) auf die Steigerung der Elimination von Radioaktivität aus dem Serum (*Blut) 16 Std nüchterner Ratten nach i.v. Injektion von Glucose-U- ^{14}C (1,5 g/kg, 13,3 $\mu\text{Ci/kg}$)

[Statistik: (–) : $p > 0,05$, (+) : $p < 0,05$, (++) : $p < 0,02$]

Tag	Anstieg des Eliminationskoeffizienten (k_2) (in % des Kontrollwertes)	Tiere pro Gruppe
5.	19,4 (–)	9
7.	25,0 (+) 20,4 (+)	18 18
14.	25,8* (++)	16

Tabelle 5

Einfluß einer chronischen Behandlung mit **Buformin**¹ auf den Abfall der Radioaktivität im Blut nach i. v. Injektion von **Glucose-U-C¹⁴** (1,5 g/kg, 13,3 μ Ci/kg) bei 16 Stunden nüchternen Ratten. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; $\ominus$: $p > 0,05$, $+$: $p < 0,05$, $++$: $p < 0,02$) (¹ 2·35 mg/kg/Tag, 14 Tage)

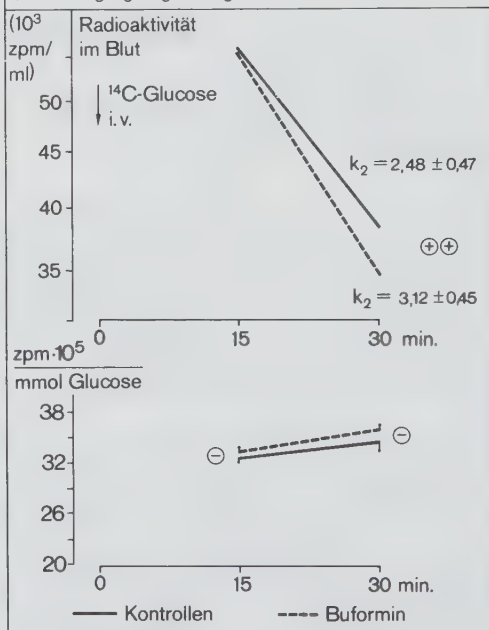


Abbildung 4

3.4.

EINFLUSS EINER BUFORMINBEHANDLUNG AUF DIE INSULINKONZENTRATION IM SERUM

3.4.1.

Insulininkretion

Ein Anstieg der durch Glucose stimulierbaren Insulinabgabe aus den β -Zellen scheidet als Ursache der verbesserten Glucosetoleranz aus. Weder bei nüchternen Tieren noch nach intravenöser Injektion verschiedener Dosen Glucose (1,5 g oder 3 g/kg) war die Insulinkonzentration im Serum bei den mit Buformin behandelten Tieren höher als bei den Kontrollen (Tab. 6, Abb. 5, Tab. 7).

Auch die intravenöse Injektion eines β -cytotropen Sulfonamids (Glymidin-Natrium, Glykodiazin) führte nach Gabe von Buformin nicht zu einer verstärkten Insulinfreisetzung (Tab. 8).

Einfluß einer Behandlung mit Buformin¹ auf die Insulinkonzentration im Serum 16 Std nüchterner Ratten

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signifikanz: — : $p > 0,05$; () = n

¹ 35 mg/kg, p.o., 3x in 24 Std

Blutentnahme: 75 min nach der letzten Buforminapplikation durch Punktion der Aorta

	Seruminsulin (μ E/ml)
Kontrollen (16)	$4,2 \pm 1,1$
Buformin (16)	$2,7 \pm 0,8$
Sig. geg. Ko.	—

Tabelle 6

Einfluß einer Behandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die durch Glucose¹ stimulierbare Insulinabgabe² bei 16 Std nüchternen Ratten

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signifikanz: — : $p > 0,05$, + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,02$, () = n

¹ 3 g/kg, i.v., 60 min nach der 3. Behandlung

² gemessen als Insulinkonzentration im Serum des peripheren Venenblutes, Punktion der V. cava caudalis 15 min nach Glucoseinjektion

	Seruminsulin (μ E/ml)		
	Kontrollen	Signifikanz	Glucose
ohne Vorbehandlung	$3,3 \pm 1,3$ (16)	++	$39,0 \pm 7,2$ (16)
Signi- fikanz	—		—
mit Buformin vorbehandelt	$2,6 \pm 0,8$ (16)	++	$45,1 \pm 5,1$ (15)

Einfluß einer chronischen Behandlung mit **Buformin**¹ auf die durch Glucose stimulierbare **Insulininkreton**² bei 16 Stunden nüchternen **Ratten**. ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Sig. geg. Ko: $\ominus p > 0,05$)

(¹2·tägl., p.o., 14 Tage, ²Seruminsulin 15 min. nach i.v. Injektion von 1,5 g/kg Glucose).

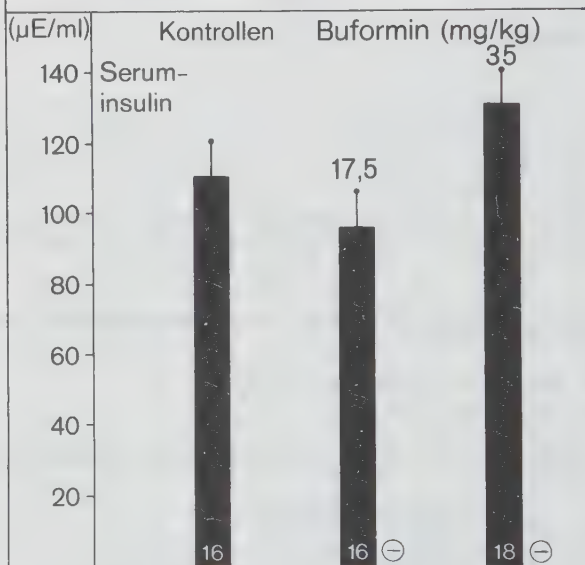


Abbildung 5

Einfluß einer Behandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die durch Glymidin-natrium¹ stimulierbare Insulininkreton² bei 16 Std nüchternen Ratten

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: $- : p > 0,05$; $+: p < 0,05$, $++ : p < 0,02$; () = n

¹250 mg/kg, i.v., 60 min nach der 3. Behandlung

²gemessen als Insulinkonzentration im Serum des peripheren Venenblutes (V. cava caudalis), 15 min nach Glymidin-Na-Injektion.

	Seruminsulin (µE/ml)		
	Kontrollen	Signifikanz	Glymidin-Na
ohne Vorbehandlung	3,3 ± 1,3 (16)	++	9,8 ± 1,9 (16)
Signi- fikanz	—		—
mit Buformin vorbehandelt	2,6 ± 0,8 (16)	++	7,9 ± 1,6 (16)

Tabelle 8

3.4.2.

Insulinstoffwechsel

Auch eine Beeinflussung des Insulinstoffwechsels durch Buformin erscheint unwahrscheinlich.

Nach intravenöser Injektion von 1 IE/kg Insulin fiel der Insulingehalt des Serums unter dem Einfluß von Buformin nicht langsamer ab, als bei den Kontrollen. Dieser Versuch wurde an 24 Std. nüchternen normalen Ratten durchgeführt, deren basale Insulinkonzentration im Serum infolge der erniedrigten Blutglucose sehr gering ist und bei der Beurteilung des Konzentrationsabfalles nach Injektion exogenen Insulins nicht berücksichtigt zu werden braucht (Abb. 6).

Gegen eine Beeinflussung des Insulinstoffwechsels sprechen auch Versuche an streptozotocindiabetischen Ratten, also an Tieren mit ausgeschalteter endogener Insulinproduktion. Nach intravenöser Injektion von 0,5 IE/kg Rinderinsulin fiel nach Vorbehandlung mit Buformin innerhalb von 13 Minuten die Insulinkonzentration im Serum um nahezu den gleichen Prozentsatz ab, wie bei den Kontrollen (Tab. 9).

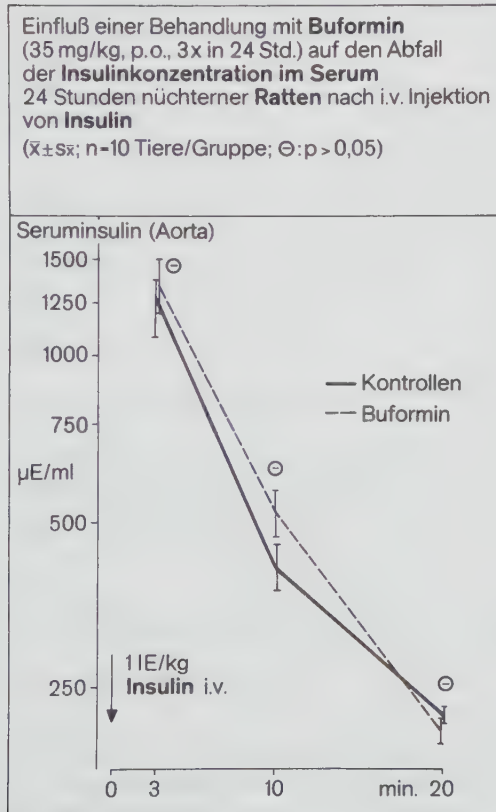


Abbildung 6

Einfluß einer Behandlung mit Buformin¹ auf den Abfall der Insulinkonzentration im Serum 16 Std nüchterner streptozotocindiabetischer² Ratten nach i.v. Injektion von Insulin³

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signifikanz: — : $p > 0,05$; () = n]

¹35 mg/kg, p.o., morgens und abends bis zum 3. Tag

²80 mg/kg, i.v., 7 Tage

³0,5 IE/kg, i.v., 75 min nach der letzten Buforminapplikation

Blutentnahme: Punktion des retrobulbären Venenplexus

	Seruminsulin		
	2 min	15 min	
	nach Insulininjektion		
	$\mu\text{E/ml}$		% des 2 min-Wertes
Kontrollen (14)	527,9 $\pm$ 73,8	61,8 $\pm$ 5,9	84,8 $\pm$ 2,3
Buformin (11)	611,8 $\pm$ 72,8	57,6 $\pm$ 4,0	88,8 $\pm$ 1,9
Sig. geg. Ko.	—	—	—

Tabelle 9

3.5.

EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE BLUTZUCKERSENKENDE WIRKUNG VON INSULIN BEI NORMALEN UND DIABETISCHEN RATTEN

3.5.1.

Versuche an normalen Tieren

Wie die unter 3.4. dargestellten Befunde zeigen, scheidet eine Steigerung der Insulininkretion oder eine Hemmung des Insulinabbaus mit großer Wahrscheinlichkeit als Ursache der durch Buformin verbesserten Glucosetoleranz aus. Es dürfte sich hierbei vielmehr um eine Wirkungssteigerung des endogenen, unter dem Einfluß der Glucose abgegebenen Insulins handeln. Hierfür sprechen Versuche, in denen die blutzuckersenkende Wirkung exogenen Insulins geprüft wurde.

Nach Vorbehandlung mit Buformin war 15 min nach i.v.-Injektion von 1 IE/kg Alt-Insulin die Glucosekonzentration im Blut stärker abgesunken als bei den Kontrollen. Dieser Effekt war in geringerem Maße im arteriellen, in stärkerem Ausmaß im venösen Blut nachweisbar (Tab. 10).

In gleicher Weise wurde auch die blutzuckersenkende Wirkung von Glymidin-Natrium, einer β -cytotropen Substanz, verstärkt. Allerdings war dieser Effekt nur in der ersten Phase nach Applikation des Sulfonamids nachweisbar (Tab. 11, oberer Teil). 15 min nach i.v.-Injektion einer maximal wirksamen Dosis von 250 mg/kg Glymidin-Natrium wurden sowohl im arteriellen als auch im venösen Blut erheblich niedrigere Blutglucosekonzentrationen gemessen, wenn die Tiere Buformin erhalten hatten. Sobald der maximale, unter den jeweiligen Versuchsbedingungen erreichbare Effekt des Sulfonylpyrimidins aufgetreten war, wurden keine Unterschiede mehr zwischen vorbehandelten Ratten und Kontrolltieren beobachtet (Tab. 11, mittlerer und unterer Teil). Bei diesen Versuchen wurde das Ausmaß der stärksten Blutglucoseerniedrigung durch eine niedrigere Dosis und unterschiedliche Applikationsformen variiert.

Offenbar beschleunigt Buformin zwar den Eintritt der Wirkung des Sulfonamids, erhöht jedoch nicht ihr Maximum.

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin¹ auf die blutzuckersenkende Wirkung von exogenem Insulin² bei 16 Std nüchternen Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signif. geg. Kontr.: - : $p > 0,05$, + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,02$;
() = n; ¹35 mg/kg, p.o., 3x in 24 Std; ²1 IE/kg, i.v., 75 min nach letzter Buformingabe. Blutentnahme: 15 min nach Insulininjektion aus der Aorta u. V. cava caudalis)

Aorta	Kontrollen	Insulin	
	mg %		% d. Kontrollen
nicht vorbehandelt	75,4 $\pm$ 3,5 (14)	34,9 $\pm$ 2,0 (16)	46,3 $\pm$ 2,7 (16)
mit Buformin vorbehandelt	66,5 $\pm$ 2,4 (16)	27,7 $\pm$ 1,6 (14)	41,7 $\pm$ 2,4 (14)
	-	++	-
V. cava caud.	Kontrollen	Insulin	
	mg %		% d. Kontrollen
nicht vorbehandelt	65,5 $\pm$ 2,7 (14)	24,7 $\pm$ 1,5 (16)	37,7 $\pm$ 2,3 (16)
mit Buformin vorbehandelt	48,1 $\pm$ 3,0 (16)	12,9 $\pm$ 1,8 (14)	26,8 $\pm$ 3,7 (14)
	++	++	+

Tabelle 10

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin^{1,2} auf die blutzuckersenkende Wirkung von Glymidin-Na (Glykodiazin) bei 16 Std nüchternen Ratten

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signif. geg. Kontr.: - : $p > 0,05$, + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,02$; () = n

¹35 mg/kg, p.o., morgens und abends bis zum 2. Tag; 1. Versuch

²35 mg/kg, p.o., morgens und abends bis zum 3. Tag; 2.-3. Versuch

1. Versuch			
Dosis: 250 mg/kg Glymidin-Na, i.v., 75 min n.d. letzten Buformingabe			
Blutabnahme: nach 15 min, Aorta, V. cava caudalis			
Aorta	Kontrollen	Glymidin-Na	
	mg %	% d. Kontrollen	
nicht vorbehandelt	75,4 ± 3,5 (14)	59,8 ± 1,9 (16)	79,3 ± 2,5 (16)
mit Buformin vorbehandelt	66,5 ± 2,4 (16)	38,7 ± 1,5 (15)	58,2 ± 2,3 (15)
	-	++	++
V. cava caudalis			
nicht vorbehandelt	65,5 ± 2,7 (14)	52,1 ± 2,9 (16)	79,5 ± 4,4 (16)
mit Buformin vorbehandelt	48,1 ± 3,0 (16)	27,7 ± 1,6 (15)	57,6 ± 3,3 (15)
	++	++	++
2. Versuch			
Dosis: 62,5 mg/kg Glymidin-Na, i.v., 60 min n.d. letzten Buformingabe			
Blutabnahme: nach 60 min, Aorta			
Aorta	Kontrollen	Glymidin-Na	
	mg %	%d. Kontrollen	
nicht vorbehandelt	54,8 ± 1,0 (14)	26,3 ± 1,0 (15)	48,0 ± 1,8 (15)
mit Buformin vorbehandelt	52,6 ± 1,2 (17)	28,5 ± 1,6 (16)	54,1 ± 3,0 (16)
	-	-	-
3. Versuch			
Dosis: 62,5 mg/kg Glymidin-Na, p.o., 60 min n. d. letzten Buformingabe			
Blutabnahme: nach 60 min, Dekapitation			
Mischblut	Kontrollen	Glymidin-Na	
	mg %	% d. Kontrollen	
nicht vorbehandelt	63,2 ± 1,1 (15)	48,5 ± 1,5 (15)	76,7 ± 2,4 (15)
mit Buformin vorbehandelt	61,2 ± 1,6 (15)	51,9 ± 1,4 (18)	84,8 ± 2,3 (18)
	-	-	++

Die Differenzen zwischen den Kontrollen und mit Glymidin-Na behandelten Tieren waren in allen Fällen hochsignifikant ($p < 0,02$).

Tabelle 11

3.5.2.

Versuche an diabetischen Tieren

Auch bei Tieren mit ausgeschalteter Funktion des Insulinorgans wurde nach Buforminvorbehandlung eine Verstärkung der blutzuckersenkenden Wirkung von Insulin nachgewiesen. Als Ausdruck dieser Tatsache war die Eliminationskonstante K_2 nach i.v.-Injektion von 0,5 IE/kg Alt-Insulin erhöht (Abb. 7).

Einfluß einer chronischen Behandlung mit **Buformin**¹ auf die blutzuckersenkende Wirkung von exogenem **Insulin** bei **streptozotocindiabetischen**² Ratten.

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $\ominus$: $p > 0,05$, $+$: $p < 0,05$)

(¹ 2·35 mg/kg/Tag, 9. Tag, ² 100 mg/kg, i.v., 10 Tage)

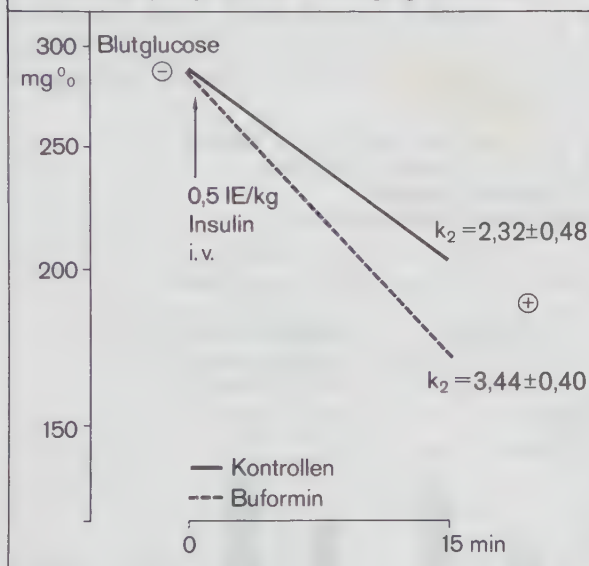


Abbildung 7

3.6.

EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE GLYKOGENKONZENTRATION IM ZWERCHFELL UND DEN EINBAU VON ^{14}C -U-GLUCOSE IN DAS ZWERCHFELLGLYKOGEN

Da der wesentliche periphere Effekt des Insulins auf einer Steigerung der Glucoseaufnahme und -utilisation in der Skelettmuskulatur beruht, wäre zu erwarten, daß bei einer Wirkungssteigerung des Hormons Glucose in erhöhtem Maße in das Muskelglykogen eingebaut wird. Zur Untersuchung dieser Frage wurde der Einbau von radioaktiver Glucose in das Zwerchfellglykogen bestimmt.

Wurde bei normalen Tieren ein i.v.-Glucosetoleranztest unter Zusatz von ^{14}C -U-Glucose durchgeführt, so nahm in gleichem Maße, in dem die Elimination des Zuckers und der Radioaktivität aus dem Blut unter dem Einfluß von Buformin gesteigert war (vergleiche 3.2. und 3.3.), auch der Einbau von ^{14}C in das Zwerchfellglykogen zu. Dieser Effekt war sowohl in Bezug auf das Feuchtgewicht der Muskelproben als auch auf die Veränderung der spezifischen Aktivität des Glykogens signifikant (Abb. 8, Tab. 12).

In gleicher Weise wurde auch bei diabetischen Ratten nach Vorbehandlung mit Buformin der Einfluß exogenen Insulins auf den Einbau von ^{14}C -U-Glucose in das Zwerchfellglykogen gesteigert. (Abb. 8, Tab. 12). Die absolute Glykogenkonzentration wurde weder bei normalen noch bei diabetischen Ratten durch die Buforminbehandlung verändert.

Einfluß einer chronischen Behandlung mit **Buformin** auf den Einbau von **Glucose-U- ^{14}C** in das **Zwerchfellglykogen normaler und streptozotocindiabetischer Ratten.**

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, - : $p > 0,05$, + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,02$)

($^1 2 \cdot 35 \text{ mg/kg/Tag}$, 7 (9) Tage, $^2 13,3 \mu\text{Ci/kg i.v.}$, 25 min)

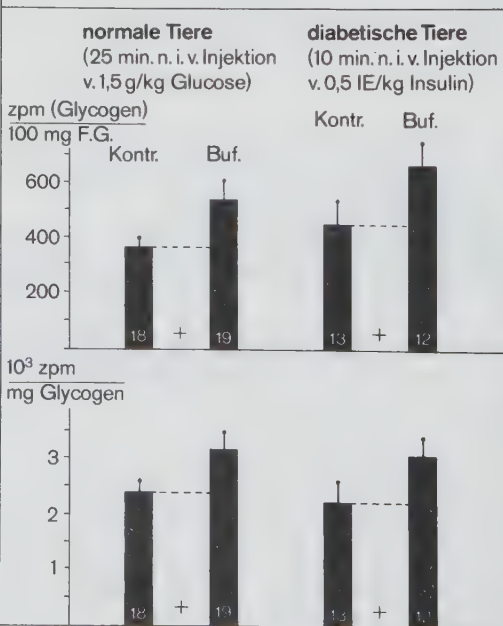


Abbildung 8

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin¹ auf den Einbau von ¹⁴C-U-Glucose² in das Zwerchfellglycogen normaler und streptozotocindiabetischer Ratten

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, Signif. > Ko.: - : p > 0,05, + : p < 0,05; ¹2 x 35 mg/kg/Tag, p.o., ²7 (*9) Tage, ²13,3 µCi/kg, i.v., 25 min, ³100 mg/kg, i.v., 10 Tage)

	normale Tiere (25 min n. i.v. Injekt. von 1,5 g/kg Glucose)		diabetische* Tiere (10 min n. i.v. Injektion von 0,5 IE/kg Insulin)	
	Kontrollen n = 18	Buformin n = 19	Kontrollen n = 13	Buformin n = 12
$\frac{\mu\text{g Glycogen}}{100 \text{ mg F.G.}}$	151,1 ± 11,8	169,0 ± 10,5 —	189,6 ± 17,8	220,8 ± 19,0 —
$\frac{\text{zpm (Glycogen)}}{100 \text{ mg F.G.}}$	365,1 ± 31,1	543,4 ± 66,5 +	448,8 ± 92,5	665,1 ± 82,4 +
$\frac{\text{zpm} \times 10^3}{\text{mg Glycogen}}$	2,39 ± 0,20	3,17 ± 0,31 +	2,24 ± 0,39	3,09 ± 0,32 +

Tabelle 12

3.7. EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE OXYDATION VON ^{14}C -U-GLUCOSE ZU $^{14}\text{CO}_2$

Bei einer Steigerung der Wirkung von Insulin auf die Glucoseaufnahme in der Skelettmuskulatur müßte außerdem die Glucoseoxydation gesteigert sein. Durch Bestimmung der mit der Atemluft abgegebenen $^{14}\text{CO}_2$ -Menge nach intravenöser Injektion von ^{14}C -U-Glucose wurde diese Frage untersucht.

Nach Stimulierung der Insulininkretion durch Glucose nahm bei normalen Ratten die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion zu, wenn zugleich mit dem inaktiven Zucker ^{14}C -U-Glucose i.v. injiziert wurde. Da bei diesen Versuchen das Verhältnis zwischen Gesamtradioaktivität im Blut und Blutzuckerkonzentration bei behandelten und unbehandelten Tieren gleich war (vergl. Abb. 4), kann die abgegebene $^{14}\text{CO}_2$ -Menge als Maß für die gesamte innerhalb der Sammelperiode gebildete CO_2 angesehen werden.

In gleicher Weise geht auch bei diabetischen Tieren die Zunahme der blutzucker-senkenden Wirkung exogenen Insulins mit einem Anstieg der Glucoseoxydation einher (Abb. 9). Wie die Abbildungen 10 und 11 zeigen, nimmt diese Verbesserung des Insulineffektes durch Buformin sowohl bei normalen als auch bei diabetischen Ratten zwischen 17,5 und 70,0 mg/kg dosisabhängig zu (Abb. 10, Abb. 11). Die Dauer der Vorbehandlung spielt hierbei in gleicher Weise wie bei der Verbesserung der Glucosetoleranz nur eine untergeordnete Rolle (Tab. 13).

Daß diese Steigerung der Glucoseoxydation an die Anwesenheit von Insulin gebunden ist, zeigen Versuche an streptozotocindiabetischen Tieren, denen kein Insulin injiziert wurde. Trotz einer Verlängerung der CO_2 -Sammelperiode auf 30 min konnte zwischen behandelten und unbehandelten Tieren kein signifikanter Unterschied in der ausgeatmeten Radioaktivität festgestellt werden (Tab. 14).

Einfluß einer chronischen Behandlung mit Buformin¹ auf den Gehalt an $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft normaler und alloxandiabetischer Ratten nach i.v. Injektion von Glucose-U- ^{14}C ²
($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, ++: $p < 0,02$). (¹ 2·35 mg/kg/Tag, 5 Tage, ² 13,3 $\mu\text{Ci/kg}$ i.v., 25 min)

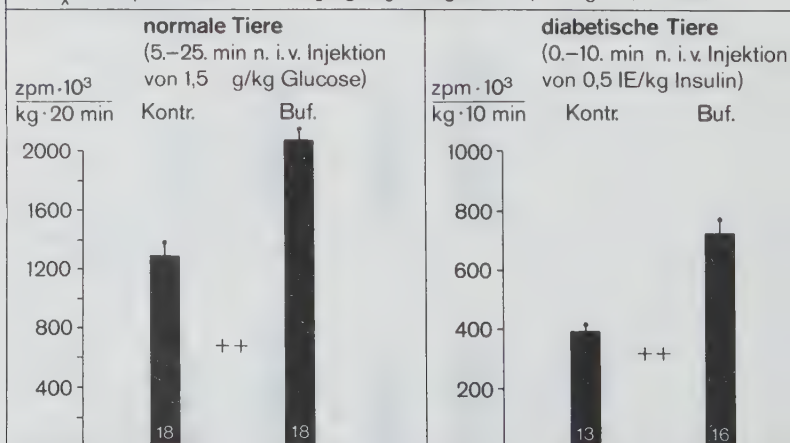


Abbildung 9

Einfluß einer Vorbehandlung mit **Buformin**¹ auf die **Glucoseelimination** aus dem Blut und die **¹⁴CO₂-Bildung** aus **¹⁴C-U-Glucose**² bei 16 Std. nüchternen **Ratten** nach Stimulation der Insulininkretion durch **Glucose**² ($\bar{x} \pm s_x$; -: $p > 0,05$; +: $p < 0,05$; ++: $p < 0,02$; ¹3 x in 24 Std.; ²13,3 μ Ci/kg, 1,5 g/kg, i.v., 60 min. n. d. 3. Behandlung)

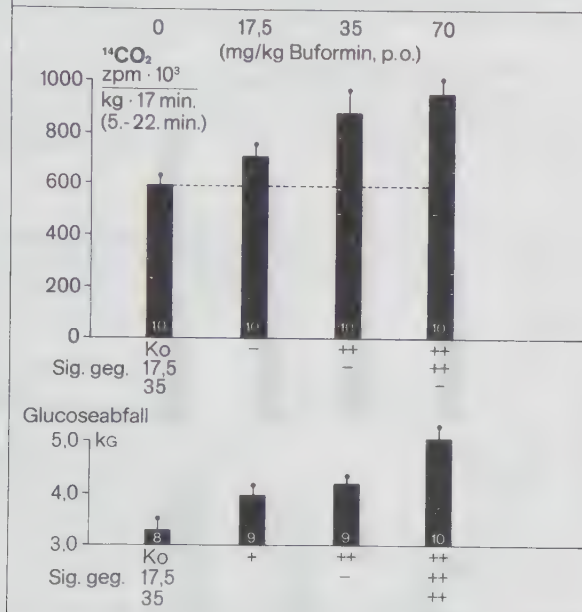


Abbildung 10

Einfluß der Dauer einer Buforminbehandlung auf die Steigerung der **¹⁴CO₂-Bildung** nach i.v. Injektion von (**¹⁴C-U-**) Glucose (1,5 g/kg, 13,3 μ Ci/kg)

[Statistik: -: $p > 0,05$; +: $p < 0,05$; ++: $p < 0,02$]

Tag	¹⁴ CO ₂ -Anstieg in % der Kontrollen			Tiere pro Gruppe
	17,5 mg Buformin/kg, p.o., morgens u. abends	35	70	
1.	—	29,9 (++)	28,8 (++)	12
2.	18,3 (-)	47,6 (++)	60,1 (++)	10
5.	—	55,7 (++)	—	18
	—	18,8 (+)	—	18
7.	—	30,8 (++)	—	18

Tabelle 13

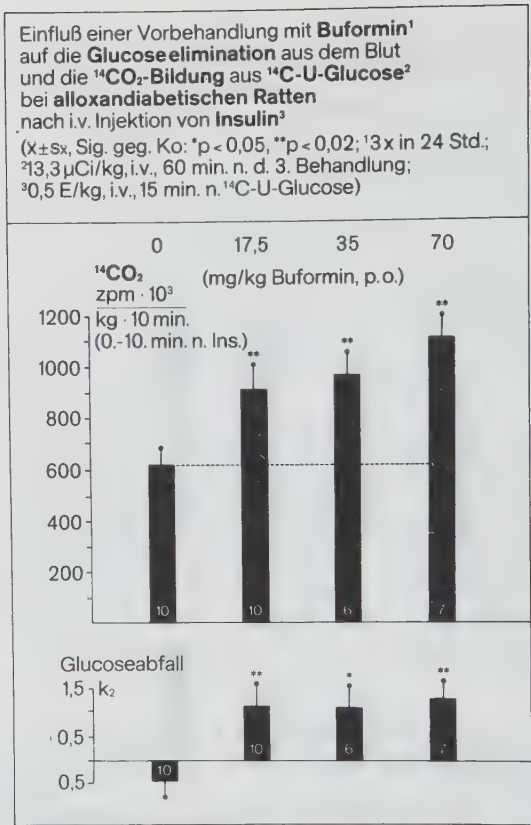


Abbildung 11

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std.) auf die Glucosekonzentration im Blut und die ¹⁴CO₂-Bildung aus ¹⁴C-U-Glucose¹ bei streptozotocindiabetischen² Ratten (ohne exogenes Insulin)

($\bar{x} \pm s_x$; Signif. gegen Kontrollen: — : $p > 0,05$; () = n; ¹13,3 μ Ci/kg, i.v., 85 min nach der letzten Behandlung; ²80 mg/kg, i.v., 2 Tage)

	Blutglucose			¹⁴ CO ₂
	vor	90 min nach	120 min nach	90.-120 min nach
	der letzten Buforminapplikation			
	mg %	% des Vorwertes		zpm x 10 ³ /kg/30 min
Kontrollen (10)	249,8 ± 5,3	91,4 ± 3,8	107,2 ± 2,8	727,0 ± 36,1
Buformin (10)	256,8 ± 7,2	97,7 ± 6,2	104,2 ± 7,3	837,0 ± 83,9
Sig. gegen Ko.	—	—	—	—

Tabelle 14

3.8. EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE ARTERIOVENÖSE BLUTGLUCOSEDIFFERENZ

Wie nicht anders zu erwarten war, ging die Steigerung der insulinabhängigen Glucoseutilisation mit einer vermehrten peripheren Glucoseaufnahme einher. Diese Tatsache ergab sich aus einer Bestimmung der arteriovenösen Blutglucosedifferenz zwischen der Aorta und der Vena cava caudalis.

Sowohl bei nüchternen Tieren, das heißt unter den Bedingungen einer basalen Insulinsekretion, als auch nach Stimulation der Hormonfreisetzung durch Glymidin-Natrium oder intravenöser Injektion exogenen Insulins hatte die arteriovenöse Glucosedifferenz auf das Doppelte des jeweiligen Kontrollwertes zugenommen (Abb. 12).

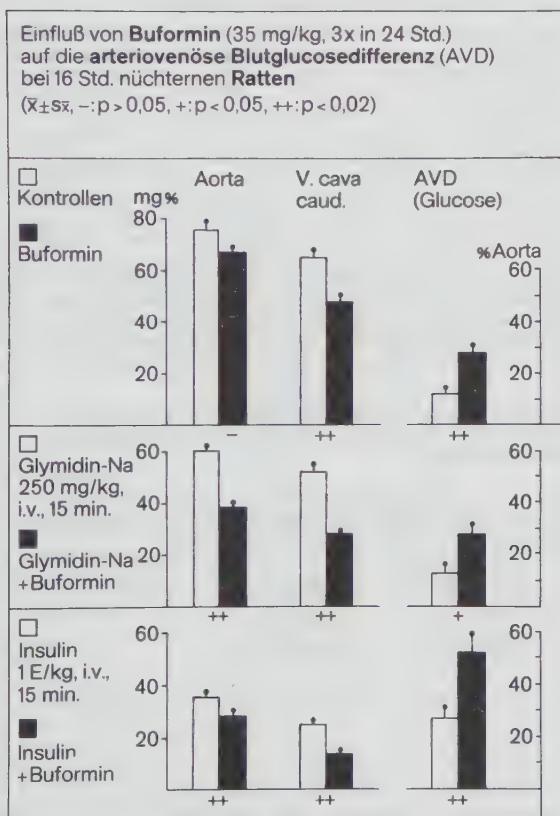


Abbildung 12

3.9.

EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE LACTATKONZENTRATION IM BLUT UND IN DER SKELETMUSKULATUR UND DIE PYRUVATKONZENTRATION IM BLUT

Die Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung unter dem Einfluß der verwendeten niedrigen Buformindosen spricht dagegen, daß unter diesen Bedingungen der oxydative Stoffwechsel in der gleichen Weise wie nach Applikation blutzuckersenkender Dosen behindert wird und die verbesserte Glucosetoleranz lediglich auf einer gesteigerten Glykolyse beruht. Der gleiche Schluß läßt sich aus der Bestimmung der Lactat- und Pyruvatkonzentration im Blut sowie der Lactatkonzentration in der Skelettmuskulatur ziehen.

Zwar ging die Steigerung der Glucoseelimination aus dem Blut nach intravenöser Glucosebelastung mit einer Erhöhung des Lactatgehaltes im Blut einher (Tab. 15).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß die Ursache dieses Milchsäureanstiegs nicht in der Skelettmuskulatur zu suchen ist.

Bei einer Parallelbestimmung der Lactatkonzentration in verschiedenen Gefäßgebieten nach Behandlung mit Buformin wurde die deutlichste Erhöhung im Pfortaderblut gemessen. Dies ist verständlich, da nach oraler Gabe der Substanz im Darmepithel die höchsten Konzentrationen auftreten dürften und daher dort am ehesten mit einer Beeinträchtigung des oxydativen Stoffwechsels zu rechnen ist. Da die arteriovenöse Lactatdifferenz nur zwischen Aorta und Vena portae, nicht jedoch zwischen Aorta und Vena cava caudalis signifikant gesteigert war, kann man vermuten, daß die leichte Vermehrung der Milchsäurekonzentration im peripheren arteriellen und venösen Blut auf einem vermehrten Einstrom aus dem Darmbereich und nicht aus der Muskulatur beruht (Abb. 13). Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß die Lactatkonzentration in der Skelettmuskulatur bei den mit Buformin behandelten Ratten nicht signifikant erhöht war (Tab 16). Gegen eine allgemeine Störung des oxydativen Stoffwechsels spricht auch die Tatsache, daß die geringfügige Erhöhung der Lactatkonzentration im peripheren Blut nicht mit einer Abnahme des Pyruvatgehaltes einherging. Der Lactat-Pyruvat-Quotient, der Rückschlüsse auf den Redox-Zustand des Organismus erlaubt, war nach Vorbehandlung mit Buformin nicht signifikant verändert (Abb. 14).

Einfluß einer Behandlung mit Buformin (35 mg/kg, p.o., 3x in 24 Std) auf die Lactatkonzentration im Blut 16 Std nüchterner Ratten (unter den Bedingungen eines i.v.-Glucosetoleranztests¹)

$(\bar{x} \pm s_{\bar{x}}; \text{Signifikanz: } - : p > 0,05; + : p < 0,05, ++ : p < 0,02; ^1 1,5 \text{ g/kg, i.v., 60 min nach der 3. Buforminapplikation; Blutentnahme nach Glucoseinjektion: 5 min: Glucosebest., 22 min: Glucose- und Lactatbestimmung})$

	Lactat (mg %)	k _G
Kontrollen (12)	13,9 ± 1,2	3,62 ± 0,30
Buformin (11) Sig. > Ko.	25,1 ± 1,3 ++	4,28 ± 0,23 +

Tabelle 15

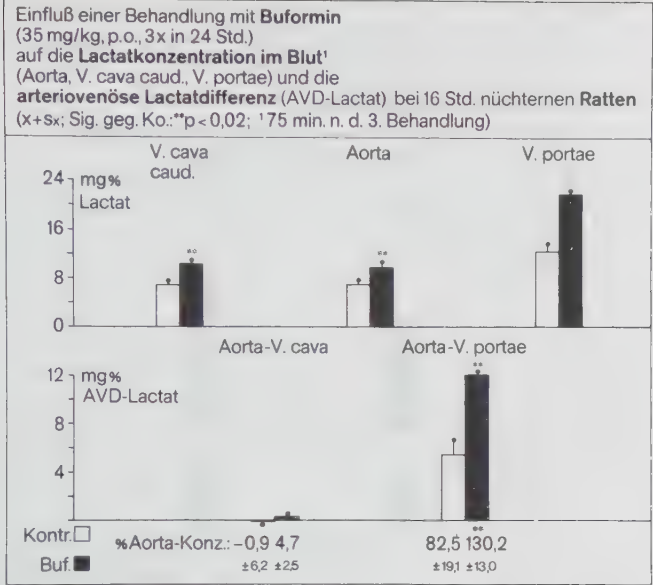


Abbildung 13

Einfluß einer Behandlung mit Buformin (2 x 35 mg/kg, p.o., 3 x in 24 Std)
auf die Lactatkonzentration in der Skelettmuskulatur 16 Std nüchterner Ratten

[$\bar{x} + s_{\bar{x}}$; Sig. gegen Kontrollen: — : p > 0,05; Gewebeernte: 75 min nach der letzten Buforminapplikation]

	Lactatkonzentration in der Skelettmuskulatur (µmol/g FG)
Kontrollen (10)	0,61 ± 0,11
Buformin (10)	1,31 ± 0,33
Sig. geg. Kontr.	—

Tabelle 16

Einfluß einer Behandlung mit **Buformin**
 (35 mg/kg, p.o., 3x in 24 Std.)
 auf die **Lactat-** und **Pyruvatkonzentration**¹
 im peripheren **Venenblut**²
 bei 16 Std. nüchternen **Ratten**
 ($\bar{x} \pm s_x$; Signif.: - : $p > 0,05$; ++ : $p < 0,02$; n=10 Tiere/Gruppe;
¹ 75 min. n. d. 3. Behandlung; ² V. cava caud.)

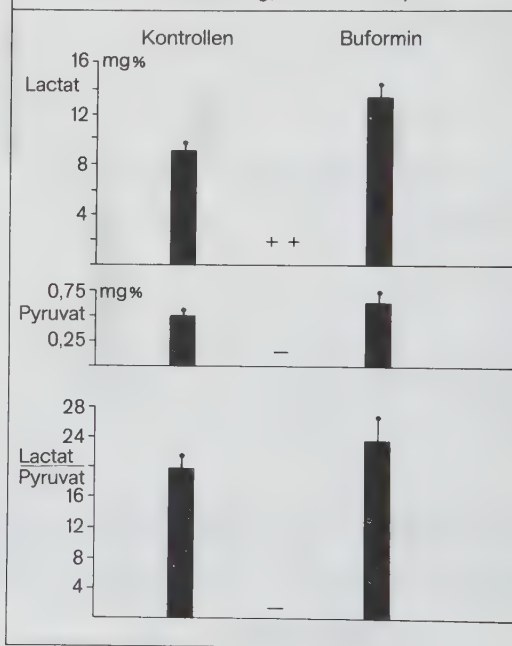


Abbildung 14

3.10.
EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE VERTEILUNG VON I-ARABINOSE

Die Ursache der verbesserten peripheren Glucoseaufnahme und -utilisation könnte auf einer Steigerung des insulinabhängigen zellulären Glucosetransportes beruhen. Zur Untersuchung dieser Frage wurden Versuche mit I-Arabinose durchgeführt. Dieser Zucker gelangt durch das gleiche Transportsystem in den intrazellulären Raum der Skelettmuskulatur wie Glucose, wird aber dort nicht phosphoryliert (RANDLE, 1960). Aus seiner Verteilung im Organismus können daher Rückschlüsse auf die Aktivität des Glucosetransportes gezogen werden.

Bei normalen Ratten, denen I-Arabinose intravenös injiziert wurde, fiel die Konzentration dieser Pentose im Blut unter dem Einfluß von Insulin ab. Dieser Abfall und damit auch die Aufnahme in Zellen, an denen Insulin den Zuckertransport steigert, verlief schneller, wenn die Tiere mit Buformin behandelt wurden (Abb. 15).

Eine gleiche Aussage erlauben Versuche an alloxandiabetischen Ratten, bei denen das I-Arabinoseverteilungsvolumen nach Ausschaltung der Nierenfunktion zur Verhinderung der renalen Zuckerelimination bestimmt wurde. Nach Vorbehandlung mit Buformin war der unter dem Einfluß von Insulin gemessene I-Arabinoseverteilungsraum gegenüber den Kontrollen signifikant vergrößert (Tab. 17).

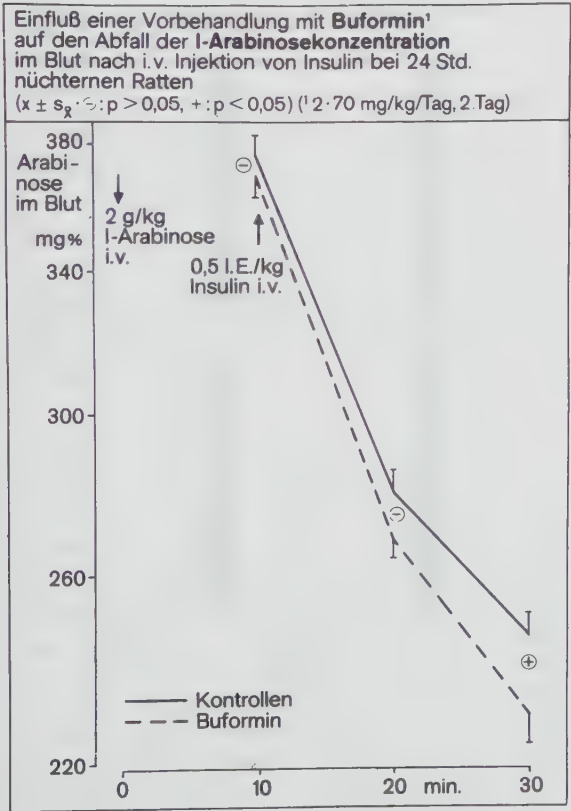


Abbildung 15

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin¹ auf das I-Arabinoseverteilungsvolumen (AVV) alloxandiabetischer² nephrektomierter Ratten nach i.v. Injektion von Insulin

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; ++ : $p < 0,02$; ¹ 2x35 mg/kg/Tag, p.o., 5 Tage; ² 80 mg/kg, i.v., 7 Tage)

	Kontrollen n = 15	Buformin n = 8
AVV (% Körpergewicht)	28,6 ± 0,4	++ 31,2 ± 0,7 (=111,4 ± 2,5 % d. Kontr.)

Versuchsanordnung

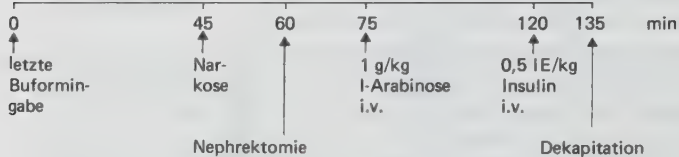


Tabelle 17

3.11.
EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE HEXOKINASEAKTIVITÄT IN DER
SKELETMUSKULATUR

Eine Steigerung der Glucosephosphorylierung ist nicht an der Erhöhung des peripheren Glucoseverbrauches beteiligt. Die Umsatzgeschwindigkeit der Muskelhexokinase wird weder in vitro durch einen Zusatz von Buformin erhöht (LOSERT, 1969 – unveröffentl. Untersuchungen) noch kommt es in vivo nach Vorbehandlung mit Buformin zu einem Aktivitätsanstieg des Enzyms in der Skelettmuskulatur (Abb. 16).

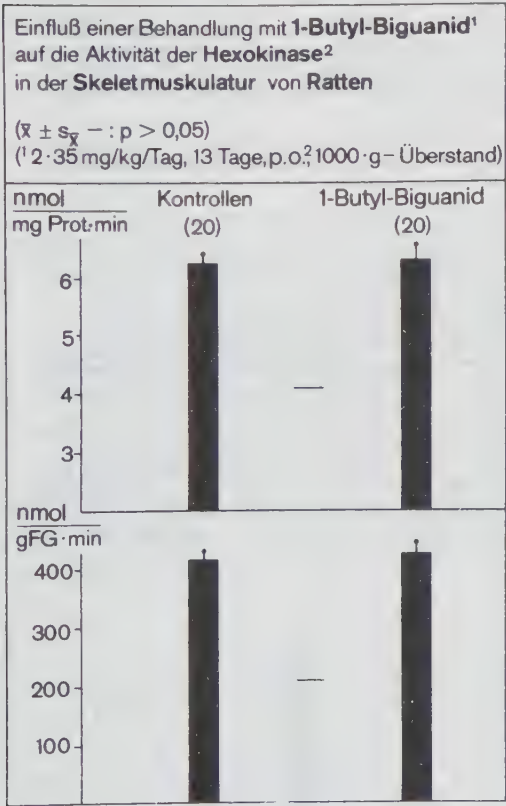


Abbildung 16

3.12.

EINFLUSS VON BUFORMIN AUF DIE KONZENTRATION DER FREIEN FETTSÄUREN IM SERUM UND DIE OXYDATION VON ^{14}C -1-PALMITINSÄURE ZU $^{14}\text{CO}_2$

Anlaß zu diesen Untersuchungen waren die bereits zitierten humanpharmakologischen Befunde von GOMEZ und FELBER (1970), die auf eine Einschränkung der Fettsäureoxydation als Ursache der verbesserten Glucoseoxydation hinweisen.

3.12.1.

Untersuchungen an nüchternen Tieren

Zur Untersuchung dieser Frage wurde zunächst die Fettsäurekonzentration im Serum nüchterner Ratten nach Vorbehandlung mit Buformin bestimmt. Unter der Voraussetzung einer konstanten Lipolyserate kann man bei einer Einschränkung der Fettsäureutilisation erwarten, daß die Konzentration der freien Fettsäuren (FFS) im Serum ansteigt.

Wie die Tabelle 18 zeigt, war nach Buforminbehandlung in einigen Fällen der FFS-Gehalt im Serum gegenüber den Kontrollen gesteigert. Dieser Effekt war allerdings geringfügig und nur in einem Fall statistisch einwandfrei zu sichern.

Eine stärkere Zunahme des FFS-Gehaltes im venösen, aus der Muskulatur abströmenden Blut, war gegenüber der arteriellen Konzentration nicht nachweisbar. Um weiteren Aufschluß über die Frage nach einer möglichen Hemmung der Fettsäureverwertung in der Skelettmuskulatur zu erhalten, wurde daher die Oxydation von ^{14}C -1-Palmitinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt.

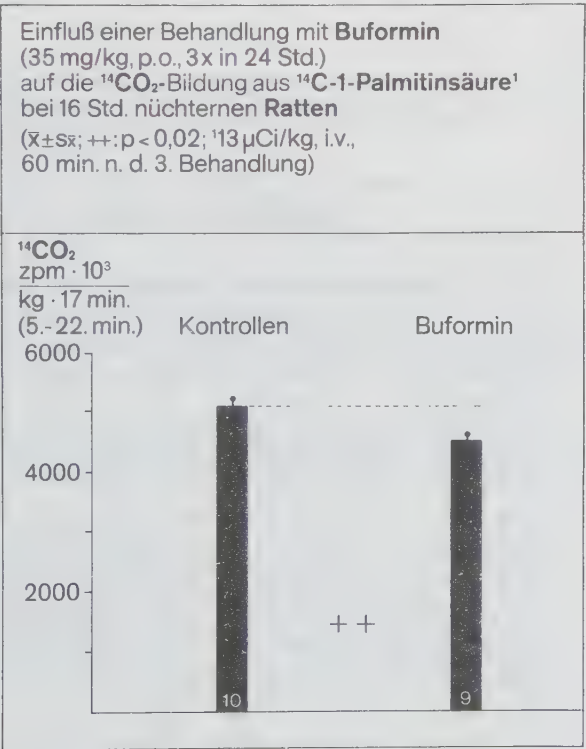
Da die markierte Palmitinsäure in einer 4%igen Rinderserumalbuminlösung injiziert wurde und Rinderserumalbumin größere Mengen an freien Fettsäuren enthält, lagen die nach 5 min gemessenen FFS-Konzentrationen höher als es nach den in Tabelle 18 gezeigten Ergebnissen zu erwarten gewesen wäre. Dies erklärt die Abnahme der Fettsäurekonzentration während der folgenden, bis zur 22. Minute dauernden CO_2 -Sammelperiode. Da die Radioaktivität im Serum um etwa den gleichen Prozentsatz abfiel, veränderte sich der Quotient zwischen Aktivität und Fettsäurekonzentration während dieser Zeit nur unwesentlich. Die bei den behandelten Tieren errechneten Werte lagen geringfügig über dem Kontrollniveau. Aufgrund dieser Tatsache kann aus der zugleich verminderten Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ auf eine Hemmung der Fettsäureoxydation unter dem Einfluß von Buformin geschlossen werden (Tab 19, Abb. 17).

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die Konzentration der freien Fettsäuren (FFS) im Serum 16 Std nüchterner Ratten

[$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Signifikanz: - : $p > 0,05$, + : $p < 0,05$, ++ : $p < 0,02$; () = n;
 Blutabnahme durch Dekapitation (Mischblut) oder Punktion der Aorta,
 V. cava caudalis, V. femoralis]

1. ohne Glucosebelastung				
Blutabnahme: 75 min nach der 3. Buformingabe				
	FFS (mval/l)			
	Mischblut	Aorta	V. cava	V.femoralis
Kontrollen (10)	0,75 ± 0,07			
Buformin (10)	0,72 ± 0,06			
Sig. geg. Ko.	-			
Kontrollen (10)		0,81 ± 0,02	0,98 ± 0,02	
Buformin (10)		0,92 ± 0,03	1,11 ± 0,04	
Sig. geg. Ko.		-	++	
Kontrollen (8)		0,66 ± 0,03	0,85 ± 0,03	0,82 ± 0,04
Buformin (8)		0,77 ± 0,05	0,85 ± 0,08	0,90 ± 0,06
Sig. geg. Ko.		-	-	-

Tabelle 18



Einfluß einer Behandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die Konzentration freier Fettsäuren (FFS) im Serum, die ¹⁴CO₂-Bildung und die Radioaktivität im Serum nach i.v. Injektion von ¹⁴C-1-Palmitinsäure¹ bei 16 Std nüchternen Ratten

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; - : p > 0,05, + : p < 0,05, ++ : p < 0,02, * sig. > Kontrollen;
¹ 13µCi/kg, i.v., 60 min nach der 3. Buforminappliation;
 Meßperiode: 5-22. min nach Injektion der Radioaktivität].

1. ohne Injektion von Glucose							
	FFS		Serumaktivität		Serumaktivität FFS-Konzentration		¹⁴ CO ₂
	5. min	22. min	5. min.	22. min	5. min	22. min	5.-22. min
	mval/l		10 ³ zpm/ml		10 ³ zpm/µval		10 ³ zpm/kg/17 m
Kontrollen (10)	1,13 ± 0,06	0,68 ± 0,05	36,0 ± 1,0	23,6 ± 1,3	31,4 ± 1,9	36,8 ± 3,6	5090,5 ± 111,6
Buformin (9)	1,00 ± 0,09	0,63 ± 0,04	36,2 ± 0,92	26,3 ± 0,8	38,2 ± 2,8	43,8 ± 3,8	4507,6 ± 61,4
Sig. geg. Ko.	-	-	-	-	+	-	++

Tabelle 19

3.12.2. Untersuchungen nach intravenöser Injektion von Glucose

Anschließend wurde geprüft, ob sich diese Veränderung der Fettsäureoxydation auch unter Bedingungen nachweisen läßt, unter denen die Verbesserung der Glucoseutilisation durch Buformin besonders deutlich erkennbar ist. Deshalb wurde die FFS-Konzentration im Serum und die Oxydation von ¹⁴C-1-Palmitinsäure nach intravenöser Injektion von Glucose, das heißt im Rahmen eines Glucosetoleranztestes bestimmt.

Die FFS-Konzentration im Serum nahm unter dem Einfluß des vermehrt abgegebener Insulins bei behandelten und unbehandelten Tieren ab. Dieser Abfall war nach Gaben von Buformin nicht geringer als bei den Kontrollen, sondern sogar etwas größer (Tab. 20).

Auch die ¹⁴CO₂-Bildung aus radioaktiver Palmitinsäure wurde unter diesen Bedingungen durch Buformin nicht herabgesetzt. Allerdings ist dieser Befund nicht eindeutig, da während der Meßperiode das Verhältnis zwischen Radioaktivität und FFS-Konzentration im Serum gegenüber der Kontrollgruppe zunahm. Dies bedeutete, daß der Anteil der markierten Palmitinsäure an der Gesamtkonzentration der FFS zunahm und daher bei gleichem Umsatz auch der Prozentsatz der ¹⁴CO₂ an der gesamten Kohlensäuremenge größer werden muß. Aus diesem Grunde kann die bei den behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen unveränderte ¹⁴CO₂-Menge Ausdruck einer Hemmung der Fettsäureoxydation sein (Tab. 21).

Einfluß einer Vorbehandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die Konzentration der freien Fettsäuren (FFS) im Serum 16 Std nüchterner Ratten

$(\bar{x} \pm s_{\bar{x}}; \text{Signifikanz: } - : p > 0,05, + : p < 0,05, ++ : p < 0,02; () = n; \text{ Blutabnahme durch Dekapitation (Mischblut) }]$

2. mit Glucosebelastung	
Glucose: 1,5 g/kg, i.v., 60 min nach der 3. Buformingabe Blutabnahme: 22 min nach Glucoseinjektion	
	FFS (mval/l)
	Mischblut
Kontrollen (12)	0,16 $\pm$ 0,01
Buformin (11)	0,10 $\pm$ 0,01
Sig. geg. Ko.	++

Tabelle 20

Einfluß einer Behandlung mit Buformin (35 mg/kg, 3x in 24 Std) auf die Konzentration freier Fettsäuren im Serum, die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung und die Radioaktivität im Serum nach i.v. Injektion von ^{14}C -Palmitinsäure¹ bei 16 Std. nüchternen Ratten

$- : p > 0,05, + : p < 0,05, ++ : p < 0,02, * \text{ sig. } > \text{ Kontrollen}$
 1,5 g/kg, i.v., 60 min nach der 3. Buforminapplikation;
 Meßperiode: 5.-22. min nach Injektion der Radioaktivität]

nach Injektion von Glucose (1,5 g/kg, i.v., zus. mit d. Radioaktivität)

	FFS		Serumaktivität		Serumaktivität FFS-Konzentration		$^{14}\text{CO}_2$
	5. min	22. min	5. min	22. min.	5. min.	22. min	
	mval/l		10^3 zpm/ml		$10^3 \text{ zpm}/\mu\text{val}$		$10^3 \text{ zpm/kg/17 min}$
Kontrollen (9)	0,98 $\pm$ 0,06	0,25 $\pm$ 0,01	34,4 $\pm$ 1,3	19,0 $\pm$ 1,7	36,2 $\pm$ 2,7	75,6 $\pm$ 5,9	6298,5 $\pm$ 294,1
5. min (10)	0,99 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,01	34,8 $\pm$ 1,0	19,2 $\pm$ 0,9	37,9 $\pm$ 4,1	90,8 $\pm$ 4,6	6114,1 $\pm$ 345,9
Sig. geg. Ko.	—	+	—	—	—	++*	—

a 21

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß durch Buformin in gleicher Weise wie beim Menschen auch an Ratten die Glucoseutilisation verbessert werden kann. Dieser Effekt wird mit Dosen erzielt, die 5- bis 10-fach geringer sind, als die zur Erzeugung einer akuten Hypoglykämie erforderlichen Mengen. Im Gegensatz zu der unter hohen Dosen nachweisbaren direkten Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Biguanide ist die Steigerung der Glucoseutilisation an die Anwesenheit von Insulin gebunden, da sie nur bei intakten Tieren oder bei diabetischen Ratten nach Insulin-substitution auftritt. Eine Beeinflussung der Insulininkretion oder des Insulinstoffwechsels liegt nicht vor, da nach Injektion von Glucose oder einem β -cytotropen Sulfonamid keine erhöhten Serumkonzentrationen des Hormons gemessen wurden und die Abfallgeschwindigkeit des Seruminsulins durch Buformin nicht verändert wird. Man kann daher annehmen, daß die Wirkung des Hormons verstärkt wird.

Der Ort dieses Effektes dürfte mit großer Wahrscheinlichkeit in der Skelettmuskulatur zu suchen sein. Hierfür spricht zunächst, daß die intravenöse Glucosetoleranz durch Buformin verbessert wird. Nach den Untersuchungen von CURTIS-PRIOR, TRETHERWEY, STEWART und HANLEY (1969) wird der größte Anteil intravenös injizierter radioaktiver Glucose von der Skelettmuskulatur aufgenommen. Da der wesentliche Effekt des Insulins auf einer Steigerung des Glucosetransportes in der Skelettmuskulatur und im Fettgewebe beruht (COLWICK, CORI und SLEIN, 1947; LEVINE, GOLDSTEIN, KLEIN und HUDDLESTON, 1949; LEVINE und GOLDSTEIN, 1955; HENDERSON, MORGAN und PARK, 1961; PARK, REGEN und MORGAN, 1963; CROFFORD und RENOLD, 1965), muß die Steigerung der insulinabhängigen Glucoseoxydation durch Buformin auf einer Verbesserung der Glucoseaufnahme in der Muskulatur beruhen, da die Muskelmasse einen erheblich höheren Anteil am Gesamtkörpergewicht hat als das Fettgewebe. Auf die Skelettmuskulatur als Wirkungsort weist auch der erhöhte Einbau von ^{14}C -Glucose in das Zwerchfellglykogen hin.

Dieser Lokalisation der Buforminwirkung entspricht eine verstärkte Anreicherung der Verbindung in der Skelettmuskulatur. Sowohl nach 3 als auch 24 und 48 Stunden nach einmaliger oraler Gabe von 10 mg/kg Buformin- ^{14}C wurde in der Muskulatur von Ratten ein höherer Gehalt der Radioaktivität gemessen als im Blut. Nach 24 (48) Stunden verhielten sich die Konzentrationen zwischen Gewebe und Blut wie 22 : 1 (15 : 1) (BITTERLING, 1970). Dagegen nahm der ^{14}C -Gehalt in der Niere und Leber, der 2 Stunden nach Applikation von 50 mg/kg Buformin- ^{14}C mehr als das 10-fache der Plasmakonzentration erreicht hatte, innerhalb von 24 Stunden bis zur Grenze der Nachweisbarkeit ab (BECKMANN, 1968). Buformin wird zwar bei Ratten durch Hydroxylierung in einen unwirksamen Metaboliten umgewandelt und erscheint in dieser Form zu 50 % im Harn (BECKMANN, 1966). Setzt man voraus, daß auch die in der Skelettmuskulatur nachgewiesene Aktivität zur Hälfte aus dem hydroxylierten Derivat stammt, so bedeutet dies in Anbetracht der absolut hohen Konzentrationen dennoch eine Anreicherung von Buformin in der Skelettmuskulatur. Ähnliche Befunde wurden auch für andere Biguanide mitgeteilt. So wurden zwischen 10 und 15 % der applizierten Radioaktivität konstant bis zu 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Phenformin- ^{14}C in der Skelettmuskulatur von Ratten nachgewiesen (HALL, RAMACHANDER und GLASSMAN, 1968).

Die Anreicherung von Buformin im Muskelgewebe könnte eine Erklärung dafür sein, daß die Verbesserung der Glucosetoleranz und Glucoseutilisation bei den vorliegenden Untersuchungen nach mindestens 2-tägiger Buforminbehandlung mit größerer Sicherheit auftrat, als nach einmaliger Gabe.

Die Ursache der Wirkungsverstärkung des Insulins durch Buformin konnte nicht eindeutig geklärt werden. In erster Linie muß eine Steigerung des insulinabhängigen Glucosetransports in der Skelettmuskulatur diskutiert werden. Eine Steigerung der Glucoseverwertung könnte entweder auf einer Beschleunigung des oxydativen oder glykolytischen Abbaus beruhen oder durch einen gesteigerten zellulären Transport bedingt sein. Da nicht nur die insulinabhängige Glucoseoxydation sondern auch der Einbau von Glucose in das Muskelglykogen durch Buformin verbessert wird, muß durch das Biguanid ein Stoffwechselschritt vor der Stufe des Glucose-6-phosphats beschleunigt werden. Wie die Messung der Hexokinaseaktivität ergeben hat, wird die Phosphorylierung durch Buformin nicht beeinflusst. Dagegen kann aus dem schnelleren Abstrom von l-Arabinose

aus dem Blut und der Vergrößerung des Verteilungsvolumens dieser Pentose nach intravenöser Insulininjektion auf eine Steigerung des insulinabhängigen zellulären Glucosetransports in der Skelettmuskulatur geschlossen werden.

Unklar bleibt, welche Rolle die Einschränkung der Fettsäureoxydation für die Verbesserung der Glucoseutilisation spielt. Die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum war unter dem Einfluß von Buformin nicht verändert oder leicht erhöht. Dies stimmt mit Befunden überein, die kürzlich von MUNTONI, DUCE und CORSINI (1970) nach intraperitonealer Injektion von 50 mg/kg Phenformin bei Ratten erhoben wurden. Die herabgesetzte Fettsäureoxydation kann daher nicht auf einem verminderten Fettsäureangebot an die Muskulatur als Folge einer Lipolysehemmung beruhen, wie sie durch toxische Biguanid-Dosen in vivo oder hohe Konzentrationen in vitro hervorgerufen wird (STERNE, 1964; STONE und BROWN, 1968; BROWN, STONE und STEELE, 1969; LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971). Es muß sich daher hierbei um eine direkte Beeinflussung der Fettsäureverwertung in den betreffenden Geweben handeln. Da der Muskel eines fastenden Tieres seinen Energiebedarf vorwiegend durch Utilisation von Fettsäuren deckt, kann man mit großer Sicherheit annehmen, daß die Einschränkung der ^{14}C -1-Palmitatoxydation durch Buformin auf einer Herabsetzung der Fettsäureverwertung in diesem Gewebe beruht.

Dieser Effekt muß auf einer direkten Stoffwechselwirkung der Biguanide beruhen, da Insulin nicht primär die Fettsäureoxydation in der Skelettmuskulatur einschränkt, sondern nur mittelbar durch Hemmung der Lipolyse das Substratangebot herabsetzt (ENGEL und WHITE, 1960; CAHILL, LEBOEUF und FLINN, 1960; JUNGAS und BALL, 1963; MAHLER, STAFFORD, TARRANT und ASHMORE, 1964; FAIN, KOVACEV und SCOW, 1966; FROESCH, 1969). Obwohl bei einem verminderten Fettsäureabbau Coenzym-A in der Muskulatur in vermehrtem Maße zur Pyruvatoxydation bereitsteht und damit entsprechend den Vorstellungen von RANDLE (1965) die Glucoseaufnahme und -utilisation gesteigert wird, ist es unwahrscheinlich, daß dieser Effekt von größerer Bedeutung für die Verbesserung des Kohlenhydratstoffwechsels ist, als die Beschleunigung des insulinabhängigen Glucosetransportes durch Buformin. In diesem Fall müßte die Glucoseoxydation auch bei diabetischen Ratten, d.h. bei einem Insulinmangel, erhöht sein. Die vorliegenden Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß unter diesen Bedingungen die $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung aus ^{14}C -U-Glucose nicht zunimmt. Offenbar ist die Herabsetzung der Fettsäureverwertung durch Buformin nicht so groß, daß dadurch allein bei diabetischen Tieren die Glucoseoxydation entscheidend verbessert wird. Daß dies jedoch grundsätzlich möglich ist, zeigen Versuche von HASSELBLATT (1967). Bei einer Hemmung der Lipolyse durch 3,5-Dimethylisoxazol, die infolge einer hochgradigen Einschränkung des Fettsäureangebotes an die Muskulatur zu einer erheblich stärkeren Verminderung der Fettsäureoxydation führt, beobachtete dieser Autor, daß die Blutzuckerkonzentration alloxandiabetischer Ratten abnahm.

Mit einer wesentlichen Bedeutung der verminderten Fettsäureutilisation für die Verbesserung des Kohlenhydratstoffwechsels ist auch nicht vereinbar, daß nach intravenöser Glucosebelastung die Fettsäurekonzentration im Serum der behandelten Tiere gleich oder sogar stärker abfällt als bei den Kontrollen. Da unter diesen Bedingungen die Verbesserung der Glucoseutilisation besonders deutlich nachweisbar ist, wäre eigentlich zu erwarten, daß als Folge einer gleichzeitigen Fettsäureoxydationshemmung durch Buformin die FFS-Konzentration im Serum geringer abnähme als bei unbehandelten Tieren. Grundsätzlich besteht außerdem noch die Möglichkeit, daß die verminderte Fettsäureoxydation nach Gabe von Buformin eine Folge der gesteigerten Glucoseutilisation darstellt. Da für beide Stoffwechselvorgänge Coenzym-A benötigt wird, könnte die mit der gesteigerten Glucoseaufnahme und -utilisation zu CO_2 einhergehende vermehrte Pyruvatoxydation zu einer verminderten Bereitstellung dieses Co-Faktors (Co-A) für die Fettsäureoxydation führen. So berichteten RANDLE, GARLAND, HALES, NEWSHOLME, DENTON und POGSON (1966), daß der Anteil nicht aus dem Kohlenhydratstoffwechsel stammender Metabolite an der Substratoxydation des perfundierten Rattenherzens, der bei alleinigem Zusatz von Palmitat 88 % betrug, auf 79 % abnahm, wenn zusätzlich Glucose und Insulin zum Perfusionsmedium zugesetzt wurden. Zugleich stieg der Umsatz von Kohlenhydraten von 12 auf 21 %. Zur endgültigen Klärung der Beziehungen zwischen Glucose- und Fettsäureoxydation nach Gabe von Buformin sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Steigerung der insulinabhängigen Glucoseutilisation durch niedrige Dosen von Buformin bei der Ratte kann zwar als Äquivalent der von SEARLE und Mitarbeitern (SEARLE, SCHILLING, PORTE, BARBACCIA DE GRAZIA und CAVALIERI, 1966; SEARLE und CAVALIERI, 1968; SEARLE, GULLI und CAVALIERI, 1969) beim Menschen nachgewiesenen Verbesserung der Glucoseoxydation durch Biguanide und damit ihrer therapeutischen Wirkung angesehen werden. In zwei Punkten unterscheiden sich jedoch beide Effekte.

Obwohl man bei Ratten hierfür erheblich niedrigere Dosen benötigt als zur Erzeugung einer Hypoglykämie, besteht gegenüber der mittleren Tagesdosis zur Behandlung eines Diabetikers immer noch ein erheblicher Unterschied. Bei einem 70 kg schweren Menschen werden etwa 3 mg/kg verabreicht. Daß es sich bei diesen Diskrepanzen jedoch um grundsätzliche Speziesdifferenzen handeln muß, haben Versuche an Meerschweinchen ergeben (LOSERT, KRAAZ, JAHN und RILKE, 1971). Wie bereits erwähnt wurde, führt bei diesen Tieren schon eine subcutane Injektion von 25 mg/kg Buformin zu einer schweren Hypoglykämie. Durch eine mehrmalige Vorbehandlung mit 10-fach niedrigeren Einzeldosen, also 2,5 mg/kg, wurde die Glucoseoxydation nach einer intravenösen Glucosebelastung gesteigert. Diese Dosis liegt in dem aus der klinischen Anwendung der Verbindung bekannten Bereich. Ein Hinweis auf grundsätzliche artbedingte Unterschiede ergibt sich auch daraus, daß die bei Ratten nötige höhere Dosierung keinen stärkeren Lactatanstieg im Blut und in der Muskulatur zur Folge hatte, wie er nach Applikation blutzuckersenkender Dosen als Folge der Glykolysesteigerung und Oxydationshemmung beobachtet wird.

Artbedingte Unterschiede dürften auch die Tatsache erklären, daß Buformin zwar bei Ratten die Elimination intravenös injizierter Glucose aus dem Blut deutlich steigert, während beim Menschen mit der üblichen Versuchsanordnung (einmalige intravenöse Glucoseinjektion, Bestimmung der Eliminationskonstante k_G nach CONARD, 1955) ein derartiger Effekt — mit einer Ausnahme (IRSIGLER, 1969), nicht beobachtet wird (CZYZYK und LAWECKI, 1966; GOMEZ, BÜBER und FELBER, 1969; HOLLOBAUGH, RAO und KRUGER, 1970). Auch bei Meerschweinchen wird trotz einer Verstärkung der Glucoseoxydation der k_G -Wert durch Biguanide nicht erhöht (LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971). Als Ursache dieser Unterschiede kann eine unterschiedliche Aktivität des glucosetransportierenden Systems in der Peripherie angenommen werden. Während bei Meerschweinchen die Eliminationskonstante k_G bei etwa 0,7 liegt (LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971), und die Normalwerte des Menschen zwischen 1,7 und 2,0 betragen, fällt bei Ratten die Glucosekonzentration im Blut nach intravenöser Glucosebelastung erheblich schneller ab. Als Eliminationskonstanten werden Werte zwischen 3,5 und 5 gefunden (siehe Abb. 1; LOSERT, SCHILLINGER und KRAAZ, 1971). Bei einer Steigerung der Glucoseaufnahme in der Peripherie dürften Ratten daher in geringerem Maße als der Mensch und das Meerschweinchen in der Lage sein, innerhalb kurzer Zeit durch Nachlieferung von Glucose aus der Leber die Nettoveränderung der Blutzuckerkonzentration konstant zu halten. Eine Verbesserung der intravenösen Glucosetoleranz durch Biguanide wird beim Menschen erst dann deutlich, wenn durch eine Dauerinfusion von Glucose die Insulininkretion über eine längere Zeit maximal stimuliert und dadurch zugleich die Glucoseabgabe aus der Leber gehemmt wird. Unter diesen Bedingungen beobachteten GOMEZ und FELBER (1970), daß als Folge der verstärkten Insulinwirkung in der Peripherie die Glucosekonzentration im Blut der behandelten Versuchspersonen während der ganzen Infusionsdauer niedriger lag als bei den Kontrollen. Dies spricht dafür, daß unter geeigneten Versuchsbedingungen sowohl beim Menschen als auch im Tierexperiment grundsätzlich gleichartige Stoffwechseleränderungen durch Biguanide erzeugt werden können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Biguanide erniedrigen bei verschiedenen Tierarten die Glucosekonzentration im Blut. Dieser Effekt beruht auf einer insulinunabhängigen Hemmung der Gluconeogenese und einer Steigerung der Glykolyse bei gleichzeitiger Verminderung der Glucoseoxydation. Die Ursache hierfür ist eine Abnahme der ATP-Konzentration, die durch eine Störung der Zellatmung bedingt ist. Diese auf einer Vergiftung der Tiere beruhenden Veränderungen können nicht zur Erklärung der therapeutischen Wirkung von Biguaniden bei Diabetikern herangezogen werden. Klinische und experimentelle Beobachtungen am Menschen sprechen dafür, daß diese Substanzen die periphere Wirkung von Insulin verstärken und dadurch zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme und -oxydation in der Skelettmuskulatur führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich auch bei Ratten mit niedrigen, noch nicht blutzuckersenkenden Buformindosen eine gleichartige Beeinflussung des Stoffwechsels nachweisen läßt. Die Versuche wurden zu verschiedenen Zeiten nach oraler Applikation von 2 mal 17,5 mg, 35 mg oder 70 mg/kg/Tag durchgeführt.

Nach mindestens 3-maliger Behandlung mit 35 oder 70 mg/kg, d.h. vom zweiten Tage an, wurde in allen Fällen eine signifikante Verbesserung der Glucosetoleranz nach intravenöser Glucoseinjektion beobachtet.

Dieser Effekt beruht nicht auf einer Steigerung der durch Glucose stimulierbaren Insulinsekretion, da die Insulinkonzentration im Serum der behandelten Tiere nach intravenöser Glucoseinjektion nicht höher anstieg, als die der Kontrollen. Auch ein verminderter Insulinabbau scheidet aus, da bei behandelten und unbehandelten Tieren das Seruminsulin nach intravenöser Insulininjektion mit der gleichen Geschwindigkeit abnahm.

Es handelt sich vielmehr um eine Wirkungsverstärkung des Hormons, da sowohl bei normalen als auch bei alloxan- oder streptozotocindiabetischen Ratten die Glucosekonzentration im Blut unter dem Einfluß exogenen Insulins schneller abfiel, wenn die Tiere mit Buformin vorbehandelt waren.

Als Ort dieser Wirkung scheidet die Leber mit großer Wahrscheinlichkeit aus, da nach gleichzeitiger intravenöser Injektion von ^{14}C -markierter und unmarkierter Glucose die Blutzuckerkonzentration mit nahezu gleicher Geschwindigkeit abnimmt, wie die Radioaktivität im Blut.

Verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß die Insulinwirkung an der Skelettmuskulatur durch Buformin in dieser Dosierung gesteigert wird: nach intravenöser Glucosebelastung unter Zusatz von ^{14}C -U-Glucose wird Radioaktivität sowohl vermehrt in das Glykogen des Zwerchfells eingebaut als auch in Form von $^{14}\text{CO}_2$ mit der Atemluft abgegeben.

Als Ursache dieser gesteigerten peripheren Glucoseaufnahme und -utilisation muß in erster Linie eine Beschleunigung des insulinabhängigen Glucosetransportes in der Skelettmuskulatur diskutiert werden. Hierfür sprechen Versuche mit L-Arabinose, einem nicht verstoffwechselbaren Zucker, der das gleiche Transportsystem wie Glucose benutzt. Nach intravenöser Injektion fällt die L-Arabinosekonzentration im Blut buforminbehandelter Tiere unter Insulineinfluß schneller ab, und der L-Arabinoseverteilungsraum wird größer. Die Glucosephosphorylierung wird dagegen durch Buformin nicht beeinflusst, da die Hexokinaseaktivität in der Skelettmuskulatur unter dem Einfluß der Substanz nicht gesteigert war.

Außer einer Steigerung der Glucoseutilisation wurde eine Einschränkung der Oxydation von ^{14}C -1-Palmitinsäure zu $^{14}\text{CO}_2$ gemessen. Ob diese Hemmung der Fettsäureverwertung, die mit einem geringfügigen Anstieg der FFS-Konzentration im Serum einhergeht, ebenfalls ursächlich an der Verbesserung der Glucoseverwertung beteiligt ist, oder als ihre Folge angesehen werden muß, bleibt offen.

Eine klare Abgrenzung dieser, unter dem Einfluß niedriger Buformindosen beobachteten Stoffwechselveränderungen gegenüber der Vergiftung der Zellatmung durch hohe Dosen ergab sich aus dem Fehlen toxischer Symptome. Während hohe, blutzuckersenkende Biguaniddosen zu einer extremen Lactacidose führen, wurde bei den vorliegenden Versuchen lediglich ein geringfügiger Lactatanstieg im Pfortaderblut beobachtet, der durch die höhere Konzentration der Substanz im Darmepithel bei oraler Applikation zu erklären ist. Dagegen ging

die Steigerung der arteriovenösen Blutglucosedifferenz nicht mit einer Erhöhung der Lactatproduktion einher. Weder die arteriovenöse Lactatdifferenz noch die Milchsäurekonzentration in der Skelettmuskulatur waren gesteigert. Auch der Lactat-Pyruvat-Quotient im Blut blieb unverändert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTSCHULD, R.A., and F.A. KRUGER: Inhibition of hepatic gluconeogenesis in guinea pig by phenformin.
Ann. N.Y. Acad.Sci. 148, 612 (1968)
2. ATKINSON, D.E.: Regulation of enzyme activity.
Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966)
3. BALZER, H. und D. PALM: Über den Mechanismus der Wirkung des Reserpins auf den Glykogengehalt der Organe.
Naunym-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 65 (1962)
4. BECKMANN, R.: Resorption, Verteilung im Gewebe und Ausscheidung von 1-Butylbiguanid- ^{14}C -hydrochlorid.
Arzneimittelforsch. 15, 761 (1965)
5. BECKMANN, R. und G. HÜBNER: Zur Pharmakokinetik von 1-Butylbiguanid-hydrochlorid und einer Retard-Form dieser Substanz.
Arzneimittelforsch. 15, 765 (1965)
6. BECKMANN, R.: Zur Pharmakodynamik der Biguanide.
In: OBERDISSE, K., H. DAWEKE und G. MICHAEL:
2. Internales Biguanid Symposium, S.3, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1968)
7. BECKMANN, R.: Zum Wirkungsmechanismus der Biguanide beim Menschen.
Arzneimittelforsch. 19, 628 (1969)
8. BERGER, S., J.L. DOWNEY, and H.S. TRAISMAN: Effect of phenformin on the cortisone glucose tolerance test.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 859 (1968)
9. BERNIER, G.M., CH. S. SPRINGATE, and M. MILLER: Lactic acidosis and phenethylbiguanide.
J. Amer. Ass. 184, 47 (1963)
10. BIGELOW-SHERMAN, J.D., and P.P.FOA: Lactic acidosis, diabetes mellitus and the biguanide compounds.
Acta diabet. lat. 6, 507 (1969)
11. BITTERLING, G.: Verteilung von 1-Butylbiguanid- ^{14}C im Organismus des Meerschweinchens und der Ratte.
Inauguraldissertation, ehem. Med. Fak. der F.U.-Berlin, in Vorbereitung (1970)
12. BROWN, J.D., D.B. STONE, and A.A.STEELE: Mechanism of action of antilipolytic agents: Comparison of the effects of insulin, tolbutamide, and phenformin on lipolysis induced by dibutyryl cyclic AMP plus theophylline.
Metabolism 18, 926 (1969)
13. BÜCHER, TH., R. CZOK, W. LAMPRECHT und E. LATZKO: Pyruvat.
In: H.-U. BERGMAYER (Editor), Methoden der enzymatischen Analyse, S. 253-259, Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim, Bergstr. (1962)
14. BUTTERFIELD, W.J.H.: The action biguanide on the peripheral tissue.
In: OBERDISSE, K., H. DAWEKE und G. MICHAEL, 2. Internationales Biguanid Symposium 1967, S. 33 - 42, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1968

15. BUTTERFIELD, W.J.H.: The effects of phenformin on peripheral glucose utilization and insulin action in obesity and diabetes mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 724 (1968)
16. BUTTERFIELD, W.J.H., and M.J. WHICHELOW: Effect of diet, sulfonylureas, and phenformin on peripheral glucose uptake in diabetes and obesity. *Lancet* 1968/II, 785
17. CAHILL, G.F.Jr., B. LEBOEUF, and R.B. FLINN: Studies on rat adipose tissue in vitro. VI. Effect of epinephrine on glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 235, 1246 (1960)
18. CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik, Kap. 6, S. 80; 2. Auflage, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart (1969)
19. COLOWICK, S.P., G.T. CORI, and M.W. SLEIN: The effects of adrenal cortex and anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* 168, 583 (1947)
20. CONARD, V.: Mesure de l'assimilation du glucose Bases théoriques et applications cliniques. Bruxelles, Acta Med. Belg. Ed. 1955
21. CREUTZFELDT, W. and A. MOENCH: Vergleichende Untersuchungen mit den blutzuckersenkenden Guanidinderivaten Synthalin B und Phenyläthylbiguanid (DBI). (Ein Beitrag zur Frage der sog. A-Zellgifte). *Endokrinologie* 36, 167 (1958)
22. CREUTZFELDT, W.: A-Zellveränderungen nach Synthalin und DBI und die Bedeutung des Glucagons für den Wirkungsmechanismus der Guanidinderivate. *Med. Probl. Pädiatr.* IV, 306 (1959)
23. CREUTZFELDT, W., F. KÜMMERLE und E. KERN: Beobachtungen an vier Patienten mit totaler Duodenopankreatektomie wegen eines Carzinoms des Pankreas. *Dtsch. med. Wschr.* 84, 541 (1959)
24. CREUTZFELDT, W., A. APPELS, R. KATTERMANN, H. FRERICH, H. PROSCHEK, K. HUBRICH und H.D. SÖLING: Zur Wirkung von Buformin mit und ohne Kombination von Sulfonylharnstoffen auf Gewicht und verschiedene Stoffwechselgrößen bei Diabetikern. In: OBERDISSE, K., H. DAWEKE und G. MICHAEL: 2. Internationales Biguanid Symposium, 1967, S. 94, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1968)
25. CROFFORD, O.B., and A.E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 240, 3237 (1965)
26. CURTIS-PRIOR, P.B., J. TRETHEWEY, G.A. STEWART, and T. HANLEY: The contribution of different organs and tissues of the rat to assimilation of glucose. *Diabetologia* 5, 384 (1969)
27. CZYZIK, A., and J. LAWECKI: Untersuchungen über den Einfluß von Phenyläthylbiguanid auf den Verlauf von Belastungsproben mit Insulin, Tolbutamid und Glucose bei Diabetes mellitus. *Diabetologia* 2, 62 (1966)

28. DAVIDSON, M.B.,
W.R. BOZARTH,
D.R. CHALLONER, and
C.J. GOODNER: Phenformin, hypoglycemia and lactic acidosis.
New Engl. J. Med. 274, 886 (1966)
29. DITSCHUNEIT, H.,
W. LOTZ, W. FRITZSCHE
und E.F. PFEIFFER: Über den Wirkungsmechanismus blutzucker-
senkender Biguanide.
4. Kongr. Internat. Diabetes Federation,
10.-14.7.1961, Ed. Medicine et Hygiene,
Genf 1961
30. DUNCOMBE, W.C.: The colorimetric micro-determination of
long-chain fatty acids.
Biochem. J. 88, 7 (1963)
31. ENGEL, F.L., and
J.E. Jr. WHITE: Some hormonal influences on fat
mobilization from adipose tissue.
Amer. J. Clin. Nutr. 8, 691 (1960)
32. FAIN, J.N., V.P. KOVACEV,
and R.O. SCOW: Antilipolytic effect of insulin in isolated
fat cells of the rat.
Endocrinology 78, 773 (1966)
33. FAJANS, St. S.,
J.A. MOOREHOUSE,
H. DOORENBOS,
L.H. LOUIS, and
J.W. CONN: Metabolic effects of phenethylbiguanide
in normal subjects and in diabetic patients.
Diabetes 9, 194 (1960)
34. FALCONE, A.B.,
R.L. MAC, and
E. SHRAGO: A study of the action of hypoglycemia-
producing biguanide and sulfonylurea
compounds on oxydative phosphorylation
J. Biol. Chem. 237, 904 (1962)
35. FORBATH, N., and
D.W. CLARKE: The effect of phenethylbiguanide upon the
metabolism of the isolated rat diaphragm.
Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 881 (1959)
36. FROESCH, E.R.: Wirkungsmechanismus des Insulins: Die
Insulinwirkung auf das Fettgewebe.
In: E.F. PFEIFFER (Editor): Handbuch des
Diabetes mellitus. Band 1, S. 495,
J.F. Lehmanns-Verlag, München, 1969.
37. GOMEZ, F., V. BÜBER
und J.-P. FELBER: Veränderungen der Glucosetoleranz und des
Insulinspiegels bei gesunden Menschen nach
Gabe von N₁-Butylbiguanid in Retard-Form.
Klin. Wschr., 47, 1313 (1969)
38. GOMEZ, F., and
J.P. FELBER: Metabolic effects of butylbiguanide during long
lasting intravenous glucose infusion in normal
human subjects.
Horm. Metab. Res. 2, 72 (1970)
39. GOMEZ, F.,
E. JÉQUIER,
B. RÜEDI, and
J.P. FELBER: Peripheral action of butylbiguanide in man:
increased glucose uptake and glucoseoxydation.
Vortrag Nr. 65 auf der 6. Tagung der
Europäischen Gesellschaft für Diabetologie in
Warschau, 1970.
40. GUTSCHE, H. Beeinflussung des Staub-Traugott-Effektes
bei Biguanidbehandlung.
In: BERTRAM, F. und G. MICHAEL:
Internationales Biguanid-Symposium, S. 102,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1968
41. HAECKEL, R., and
H. HAECKEL: Inhibition of gluconeogenesis by phenetyl-
biguanide in the perfused guinea pig liver.
Fed. Proc. 27, 809 (1968)

42. HAESE, E.: Zur Klinik der Biguanide. *Arzneimittelforsch.*, 19, 633 (1969)
43. HALL, H., G. RAMACHANDER, and J.M. GLASSMAN: Tissue distribution and excretion of phenformin in normal and diabetic animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 601 (1968)
44. HASSELBLATT, A.: Diabetes und Fettstoffwechsel. In: *Advances in the biosciences*, 1, Schering Symposium on Endocrinology, 1967, edited by G. Raspé, p. 281, Pergamon Press. Vieweg, Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto, Sydney, Paris, Braunschweig, 1969
45. HEIK, M.: Biguanide zur Stoffwechselstabilisierung bei labilen diabetischen Kindern. In: OBERDISSE, K., H. DAWEKE und G. MICHAEL: 2. Internationales Biguanid Symposium, 1967, S. 154, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1968
46. HENDERSON, M.J., H.E. MORGAN, and C.R. PARK: Regulation of glucose uptake in muscle. *J. Biol. Chem.* 236, 2157 (1961)
47. HOHORST, H.J.: L-(+)-Lactat, Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und DPN. In: H.-U. BERGMAYER (Editor), *Methoden der enzymatischen Analyse*, S. 266, Verlag Chemie G.m.b.H., Weinheim, Bergstr., 1962
48. HOLLOBAUGH, S.L., M.B. RAO, and F.A. KRUGER: Studies on the site and mechanism of action of phenformin. I. Evidence for significant "nonperipheral" effects of phenformin on glucose metabolism in normal subjects. *Diabetes* 19, 45 (1970)
49. HORTON, E.S., B.M. SHEIKOLISLAM, and R. BRESSLER: Combined sulfonylurea-phenformin therapy of the dysinsulinism of early diabetes mellitus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 148, 778 (1968)
50. HUGGET, A.S.G., and D.A. NIXON: Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet* 1957 II, 368
51. IRRSIGLER, K.: Glucoseutilisation und Plasmalipide bei adipösen Patienten unter dem Einfluß von Dimethylbiguanid (Glucophage). *Wiener Med. Wschr.* 119, 191 (1969)
52. JANGAARD, N.O., J.N. PEREIRA, and R. PINSON: Metabolic effects of the biguanides and possible mechanism of action. *Diabetes* 17, 96 (1968)
53. JUNGAS, R.L., and E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose-tissue. XII. The effect of insulin and epinephrine on free fatty acid and glycerol production in the presence and absence of glucose. *Biochemistry (Wash.)* 2, 383 (1963)
54. JUNOD, A., A.E. LAMBERT, L. ORCI, R. PICTET, A.E. GONET, and A.E. RENOLD: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin (32 401). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126, 201 (1967)

55. KAHAN, M.,
J. HIRSHLEIFER, and
E.E. MANDEL: Serum lipids in diabetes mellitus: A comparison
of the effects of tolbutamide, phenformin-
hydrochloride and NPH-insulin.
Diabetes 15, 536 (1966)
56. KRALL, L.P.,
R.F. BRADLEY und
P.WHITE: Klinische Erfahrungen mit den Biguaniden.
in: BERTRAM, F. und G. MICHAEL:
Internationales Biguanid-Symposium, S. 86,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960
57. LEVINE, R., and
M. GOLDSTEIN: On the mechanism of action of insulin.
Recent Progr. Hormone Res. 11, 343 (1955)
58. LEVINE, R.,
M. GOLDSTEIN,
S. KLEIN, and
B. HUDDLESTON: The action of insulin on the distribution of
galactose in eviscerated nephrectomized dogs.
J. Biol. Chem. 179, 185 (1949)
59. LOGE, O.: Der chinesische Streifenhamster als Modell
in der Diabetesforschung.
Zschr. Versuchstierkunde 12, 93 (1970)
60. LOSERT, W.: Unveröffentlichte Untersuchungen (1969)
61. LOSERT, W.,
W. KRAAZ, P. JAHN und
A. RILKE: Steigerung der Glucoseoxydation durch
Biguanide bei Ratten und Meerschweinchen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.,
im Druck (1970).
62. LOSERT, W., O. LÖGE
und E. SCHILLINGER: Untersuchungen zu der durch N_1 -(n-Butyl)-
biguanid (Buformin) im Tierexperiment
verursachten Hypoglykämie.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.
264, 275 (1969)
63. LOSERT, W.,
E. SCHILLINGER und
W. KRAAZ: Tierexperimentelle Untersuchungen zur
Wirkungsweise von Biguaniden:
1. Stoffwechselveränderungen unter dem
Einfluß hoher, blutzuckersenkender Dosen.
In Vorbereitung (1971).
2. Stoffwechselveränderungen unter dem
Einfluß niedriger, nicht blutzuckersenkenden
Dosen.
In Vorbereitung (1971)
64. LOWRY, O.H.,
N.Y. ROSENBOUGH,
A.L. FARR, and
A.J. RANDALL: Protein measurement with the folin reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
65. MAHLER, R.,
W.S. STAFFORD,
M.E. TARRANT, and
J. ASHMORE: The effect of insulin on lipolysis.
Diabetes 13, 297 (1964)
66. MEHNERT, H.: Biguanides in the treatment of diabetes.
In: OSTMAN, J., and R.D.G. MILNER:
Diabetes proceedings of the sixth congress
of the international diabetes federation,
Stockholm 1967. Excerpta medica
foundation, Amsterdam 1969
67. MEHNERT, H.: Experimentelle und klinische Untersuchungen
zu Wirkungsmechanismus und Indikations-
bereich blutzuckersenkender Biguanidderivate.
Habil.-Schrift, München 1963

68. MEHNERT, H.:
Orale Antidiabetika, Grundlagen der oralen Diabetestherapie.
In: BOECKER, W., (Editor), Pankreas Diabetes.
3. Bad Mergentheimer Stoffwechseltagung, S. 119,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1965
69. MEJBAUM, W.:
Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen,
insbesondere in den Derivaten der Adenylsäure.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 258, 117 (1939)
70. MEYER, F.,
M. IPAKTCHI, and
H. CLAUSER:
Specific inhibition of gluconeogenesis by
biguanides.
Nature 213, 203 (1967)
71. MICHEL, W.:
Akute Belastungen mit Biguaniden bei Gesunden
und Diabetikern.
In: BERTRAM, F. und G. MICHAEL:
Internationales Biguanid-Symposium, S. 111,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960
72. MOHNIKE, G.:
L'étude du mécanisme d'action dérivés de
la guanidine.
Journées annuelles de diabetologie de
l'Hotel Dieu, Paris 1963
73. MORGAN, C.R., and
A. LAZAROW:
Immunoassay of insulin using a two-antibody-
system.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 111, 29 (1962)
74. MORGAN, C.R., and
A. LAZAROW:
Immunoassay of insulin: two-antibody-system.
Diabetes 12, 112 (1963)
75. MORGAN, C.R.,
R.L. SORENSON, and
A. LAZAROW:
Further studies of an inhibitor of the two-
antibody-immunoassay-system.
Diabetes 13, 579 (1964).
76. MUNTONI, S.,
M. DUCE, and
G.U. CORSINI:
Investigations on the effect of phenformin on
plasma free fatty acid levels.
Life Sciences 9, II, 241 (1970)
Pergamon Press, Great Britain
77. OTTO, H.:
Untersuchungen mit Phenyläthylbiguanid
(DBI) bei stoffwechselgesunden Menschen.
In: BERTRAM, F. und G. MICHAEL:
Internationales Biguanid-Symposium, S. 97.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960
78. PARK, C.R., D.M. REGEN,
and H.E. MORGAN:
Characterization of sugar transport in muscle.
Fed. Proc. 22 (Part I), 167 (1963)
79. PATRICK, S.J.:
Effects of phenformin and hypoglycin on
gluconeogenesis of rat tissues.
Canad. J. Biochem. 44, 27 (1966)
80. PATRICK, S.J.:
Renal gluconeogenesis, adenine nucleotides,
and enzyme activities.
Canad. J. Biochem. 46, 1345 (1968)
81. PFEIFFER, E.F.,
K. SCHÖFFLING und
H. DITSCHUNEIT:
Der Wirkungsmechanismus der oralen
Antidiabetika; Die blutzuckersenkenden
Sulfonylharnstoffe und Sulfonamide.
In: PFEIFFER, E.F.: Handbuch des Diabetes
mellitus, Band 1, S. 637.
J.F. Lehmanns-Verlag, München, 1969
82. POMERANZE, J. und
R.J. GADEK:
In: OBERDISSE, K. und K. JAHNKE (Ed.):
Diabetes mellitus, S. 440.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1959

83. PRESSMAN, B.C.: Specific inhibitions of energy transfer.
In: CHANCE, B. (Ed.): Energy-linked functions of untochondria, p. 181.
Academic Press, N.Y. 1963
84. PRESSMAN, B.C.: The effects of guanidine and alkyl guanidines on the energy transfer reactions of mitochondria
J. Biol. Chem. 238, 401 (1963)
85. RAFAELSEN, O.J.: Action of oral "antidiabetic" drugs on the carbohydrate metabolism of isolated rat diaphragm.
In: Diabetes mellitus. II. Kongreß der Internationalen Diabetes Federation
Düsseldorf.
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1959
86. RANDLE, P.J.: Monosaccharide transport in muscle and its regulation, p. 431.
In: KLEINZELLER, A., and A. KOTYK (Ed.): Membrane Transport and Metabolism,
Academic Press, London and New York 1960
87. RANDLE, P.J.: The glucose fatty acid cycle.
In: LEIBEL, B.S., and G.A. WRENSHALL (Ed.): On the nature and treatment of diabetes, p. 361.
Excerpta medica foundation, 1965
88. RANDLE, P.J.,
P.B. GARLAND,
C.N. HALES,
E.A. NEWSHOLME,
R.M.DENTON, and
C.I. POGSON: Interactions of metabolism and physiological role of insulin.
Recent Progr. Horm. Res. 22, 1 (1966)
89. SADOW, H.S.: Überblick über experimentelle und klinische Erfahrungen mit der Biguanidtherapie in den Vereinigten Staaten und Kanada.
In: BERTRAM, F. und G. MICHAEL: Internationales Biguanid-Symposium, S. 69,
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960
90. SALAS, M.,
E. VIÑUELA, and
A. SOLS: Insulin dependent synthesis of liver glucokinase in the rat.
J. Biol. Chem. 238, 3535 (1963)
91. SCHÄFER, G.: Oligomycinähnlicher Effekt von Biguaniden.
Biochem. Z. 339, 46 (1963)
92. SCHÄFER, G.: The action of biguanides on mitochondrial energy-transfer.
Vortrag auf dem 6. Internationalen Biochemie-Kongreß, Abstract, New York 1964
93. SCHWARTZ, M.J.,
MIRSKY, ST., and
L.E.SCHÄFER: The effect of phenformin-hydrochloride on serum cholesterol and triglyceride levels of the stable adult diabetic.
Metabolism 15, 808 (1966)
94. SEARLE, G.L., and
R.R. CAVALIERI: Glucose kinetics before and after phenformin in the human subject.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 734 (1968)
95. SEARLE, G.L.,
R. GULLI, and
R.R. CAVALIERI: Effect of phenformin in nondiabetic humans. Estimation of glucose turnover rate and cory cycle activity.
Metabolism 18, 148 (1969)

96. SEARLE, G.L., SCHILLING, S., D. PORTE, J.BARBACCIA, J. DE GRAZIA, and R.R. CAVALIERI: Body glucose kinetics in nondiabetic human subjects after phenethylbiguanide. *Diabetes* 15, 173 (1966)
97. SKILLMAN, TH.G., F.A. KRUGER, and G.J. HAMWI: Metabolic and endocrine studies with phenethylbiguanide (DBI). *Diabetes* 8, 274 (1959)
98. SÖLING, H.D.: Der Stoffwechsel der alloxandiabetischen Rattenleber und seine Beeinflussung durch Insulin und orale Antidiabetica; gleichzeitig ein Beitrag zum Problem der Entstehung der diabetischen Ketose. *Habil.-Schrift* 1965
99. SÖLING, H.D. und W. CREUTZFELDT: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pharmakologie und zum Wirkungsmechanismus von N_1 - β -Phenyläthylbiguanid und N_1 -n-Butylbiguanid. In: BERTRAM, F. und G. MICHAEL: Internationales Biguanid-Symposium, S.17. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1960
100. SÖLING, H.D. und H. DITSCHUNEIT: Der Wirkungsmechanismus der oralen Antidiabetica; Die Biguanide. In: PFEIFFER, E.F.: *Handbuch des Diabetes mellitus*, Band 1, S. 685. J.F. Lehmanns-Verlag, München 1969
101. SÖLING, H.D., P. KNEER, D. MOOSHAGEN, E. SCUTELLA und W. CREUTZFELDT: Die Wirkung von N_1 -n-Butylbiguanid auf den Stoffwechsel der isolierten perfundierten Leber normaler und alloxandiabetischer ketotischer Ratten *Diabetologia* 3, 318 (1967)
102. SÖLING, H.D., H. WERCHAU und W. CREUTZFELDT: Untersuchungen zur Stoffwechselwirkung von blutzuckersenkenden Biguaniden bei verschiedenen Tierspezies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. und Pharm.* 244, 290 (1963)
103. STEINER, D.F., and R.H. WILLIAMS: Respiratory inhibition and hypoglycemia by biguanides and decamethylenediguanidine. *Biochimica et Biophysica Acta* 30, 325 (1958)
104. STERNE, J.: The present state of knowledge on the mode of action of the antidiabetic diguanides. *Metabolism* 13, 791 (1964)
105. STERNE, J.: Mécanisme d'action des biguanides antidiabétiques. *La Presse Medicale* 72, 17 (1964)
106. TRANQUADA, R.E., and P.M. BEIGELMAN: The metabolic response of rat adipose tissue to DBI. *Clin. Res.* 8, 248 (1960)
107. TRANQUADA, R.E., S. BERNSTEIN, and H.E. MARTIN: Irreversible lactic acidosis associated with phenformin therapy. *J. Amer. Med. Assoc.* 184, 37 (1963)
108. TYBERGHEIN, J.M., and R.H. WILLIAMS: Metabolic effects of phenethylbiguanide: A new hypoglycemic compound. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96, 29 (1957)

109. UNGAR, G.: Pharmacology and toxicology of phenethylbiguanide (DBI). Symposium on "a new hypoglycemic agent, phenformin (DBI)". Houston, Texas 1959
110. UNGAR, G., S. PSYCHOYOS, and H.A. HALL: Action of phenethylbiguanide a hypoglycemic agent on tricarboxylic acid cycle. *Metabolism* 9, 36 (1960)
111. WEBER, E.: *Grundriß der biologischen Statistik*, S. 501. S. Fischer-Verlag, Stuttgart 1967
112. WERNER, P.: Ergebnisse oraler Diabetestherapie mit Buformin. *Dtsch. Gesundheitswesen* 24, 2181 (1969)
113. WHICHELOW, M.J., and W.J.H. BUTTERFIELD: In vivo studies in man on the hypoglycemic action of phenformin. *Postgrad. med. J.* 45, 24 (1969)
114. WILLIAMS, R.H., J.M. TYBERGHEIN, P.M. HYDE, and R.L. NIELSEN: Studies related to the hypoglycemic action of phenethyldiguanide. *Metabolism* 6, 311 (1957)
115. WILLIAMSON, J.R., R.S. WALKER, and A.E. RENOLD: Metabolic effects of phenethylbiguanide (DBI) on the isolated perfused rat heart. *Metabolism* 12, 1141 (1963)

Herrn Prof. Dr. med. Kramer danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Losert danke ich ganz besonders für die wertvollen Anregungen zum Thema und für die freundliche Durchsicht meiner Arbeit.

Der Schering AG - Berlin danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 20. September 1942 wurde ich, Wolfgang Kraaz, als zweiter Sohn des Arztes Martin Kraaz und seiner Ehefrau Gerda, geb. Hilbig, in Breslau geboren.

Von 1950 bis 1953 besuchte ich die Grundschule. 1962 legte ich auf der Shadow-Schule, einem humanistischen Gymnasium in Berlin-Zehlendorf, die Reifeprüfung ab. Danach begann ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin.

Nach dem Staatsexamen trat ich am 1. November 1969 eine Medizinalassistentenstelle im Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin an. Hier war ich 11 Monate tätig.

Seit dem 1. Oktober 1970 arbeite ich als Medizinalassistent in der Medizinischen Klinik der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz.

